



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

REGENERAÇÃO ÓSSEA

Trabalho submetido por
Roberto Alexandre Silvestre Martins
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Carla Ascenso

Novembro de 2017



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

REGENERAÇÃO ÓSSEA

Trabalho submetido por

Roberto Alexandre Silvestre Martins

para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por

Prof. Doutora Carla Ascenso

Novembro de 2017

*Segue o teu destino,
Rega as tuas plantas,
Ama as tuas rosas.
O resto é a sombra
Da árvore alheia.*

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Quero começar por agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Carla Ascenso, por ter aceite o meu convite e me ter ajudado a concluir esta importante etapa da minha vida.

Quero agradecer aos meus pais e irmão, por me terem apoiado em todas as fases da minha vida e nunca desistirem de mim. Tudo o que sou hoje deve-se a vocês, todos os ensinamentos e lições de vida que levarei para sempre, sem nunca esquecer de onde vim e de onde vocês vieram, deve-se ao esforço constante da vossa parte. Amo-vos Mãe Pai e Irmão.

À minha namorada Liliana, não tenho palavras para descrever aquilo que sinto e também a minha gratidão. Tens sido o meu grande apoio e sem ti não teria feito tudo aquilo a que me propus. Todas as noites a ver-me estudar, a fazer-me perguntas e a ajudar-me durante a realização desta tese, sem dúvida que um obrigado nunca vai chegar. Esta tese não é so minha, também é tua. Contigo aprendi que juntos somos melhores e mais fortes. Muito obrigado por tudo, Amo-te Liliana.

Aos meus tios, primos, primas, avós que acompanharam o meu percurso até aqui, um muito obrigado por tudo. Nunca esquecidos, os meus avós que estando onde estiverem levá-los-ei comigo para sempre, Avô Joaquim e Avô Fernando, um muito obrigado por cada pedaço vosso deixado em mim.

À D. Aurora, Diogo Gomes, Tiago Gonçalves, Carina e Luisa, por todo apoio que sinto da vossa parte, não são apenas a família da Liliana, são também a minha família e por isso obrigado. D. Aurora e Diogo Gomes, obrigado pela vossa companhia até à estação do pragal, sem dúvida que foram belas viagens.

Um muito obrigado a todos os meus amigos e que sempre me apoiaram e estiveram comigo, tanto na minha vida pessoal como profissional. Ao meu afilhado João Lourenço e às minhas afilhadas, Joana Videira, Joana Mendes e Joana Maximiano, um muito obrigado por me terem pedido para padrinho, espero ter correspondido às expectativas. Aos amigos da faculdade, Leonardo Matos, Rui Barros, Samuel Caraballo, Francisco Periquito, Rita Lopes, Rita Duarte, Beatriz Santos, Margarida Saial, Joana Fulgêncio, entre outros, de uma maneira ou de outra fizeram todos parte do meu percurso académico e, portanto, um muito obrigado.

Tenho também a agradecer à equipa da Fharmonat e da Eightjuice, por todo o apoio prestado durante o meu percurso académico.

Um muito obrigado à Maria Figueiredo, Claudia Lopes e Carlos Figueiredo, da clínica Fábrica do Sorriso, pelo apoio que me deram nestes últimos dias, e por todo apoio à Dr^a Liliana

Também, um especial obrigado à equipa dos serviços farmacêuticos do hospital São José.

Por fim, mas não menos importante, um obrigado a todos os professoras e equipas do curso Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, ISCSEM.

RESUMO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo mineralizado, composto por uma matriz orgânica (25%), maioritariamente composta por colagénio tipo I (90%) e proteínas não colagénicas (10%), e uma matriz inorgânica (65%), que corresponde aos cristais de hidroxiapatite que mineralizam a matriz orgânica, formando o osso.

O colagénio é a primeira linha de suporte ósseo e estrutural, onde alterações ao nível desta proteína podem conduzir a problemas ósseos e, por outro lado, os cristais de hidroxiapatite vão conferir a rigidez mecânica do osso.

A formação do osso resulta da participação de fatores de crescimento, citocinas e células, que em conjunto vão proporcionar o seu desenvolvimento e crescimento, através da osteogénese e finalizando com a remodelação óssea.

A remodelação óssea é um processo que ocorre diariamente devido às microfraturas causadas por traumas e /ou por forças de carga excessiva. Em caso de quebra óssea, em que as forças de carga foram superiores à resistência do próprio osso, o organismo recorre a mecanismos de cicatrização da fratura, que pode acontecer de forma direta ou indireta.

Quando a fratura é demasiado grande ou o processo de regeneração intrínseco falha, é necessário desenvolver uma nova estratégia, a regeneração óssea guiada através de enxertos e engenharia de tecidos. Os enxertos incluem os autoenxertos, com origem no próprio doente, e os aloenxertos, com origem num dador. A engenharia de tecido veio tentar combater os problemas imunológicos do doente (aloenxerto) e os problemas relacionados com o local dador (autoenxerto).

Sendo assim, a regeneração óssea tem o seu foco em duas áreas, nomeadamente, o campo celular com características osteogénicas e osteoindutivas e o campo matricial, composto por biomateriais com propriedades osteocondutivas.

Palavras-chave: Regeneração óssea, fraturas, enxertos

ABSTRACT

The bone tissue is a mineralized connective tissue of organic matrix (25%), mostly composed of collagen type I (90%) and non-collagenous proteins (10%), and an inorganic matrix (65%), hydroxyapatite crystals that mineralize the organic matrix, forming the bone.

Collagen is the first line of bone support and structural where changes in the level of this protein can lead to bone problems and on the other hand, the hydroxyapatite crystals will confer bone the mechanical stiffness.

The formation of the bone results from the participation of growth factors, cytokines and cells, which together will provide its development and growth, through osteogenesis and ending with bone remodeling.

Bone remodeling is a process that occurs daily due to the micro fractures caused by the effort and or by higher load force. In case of bone breaking where the load forces were superior to the bone resistance, the body uses mechanisms of fracture healing, which can happen by direct healing or indirect healing.

When the fracture is too large or the intrinsic regeneration fails, it is necessary to develop a new strategy, called guided bone regeneration, through grafts and tissue engineering. The grafts include the autografts, originating from the patient himself and allografts, originating from a donor. Tissue engineering has come to try to combat the patient's immune problems (allograft) and problems related to the donor site (autograft).

Thus, bone regeneration focuses on two areas, namely the cellular field with osteogenic and osteoinductive characteristics and the matrix field composed of biomaterials with osteoconductive properties.

Keywords: bone regeneration, fractures, grafts

ÍNDICE GERAL

RESUMO	1
ABSTRACT	3
ÍNDICE GERAL	5
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABELAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	11
INTRODUÇÃO	13
DESENVOLVIMENTO	17
MATRIZ ÓSSEA	17
Colagénio	17
Proteínas não colagénicas (NPC)	22
Matriz inorgânica	26
Mineralização	26
Componente celular	28
OSTEOGÉNESE	31
Ossificação endocondral	32
Ossificação intramembranosa	33
Remodelação Óssea	33
SISTEMA RANK/RANKL/OPG	35
Recetor ativador do fator nuclear kappa β (RANK)	36
Ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa β (RANKL)	37
Osteoprotegerina (OCP)	38
REGENERAÇÃO ÓSSEA	39
Fraturas	39
Regeneração de fraturas	40
FASE INFLAMATÓRIA	40
FASE DE FORMAÇÃO DO CALO MOLE	41
FASE ANGIOGÉNESE E NEOVASCULARIZAÇÃO	42
FASE DE FORMAÇÃO DE CALO ÓSSEO RÍGIDO	42
FORMAÇÃO DO NOVO OSSO	43
Regeneração guiada	48
ENXERTO AUTOLOGO	48

ALOENXERTOS	49
COMPONENTE CELULAR.....	51
CÉLULAS ESTAMINAIS EMBRIONÁRIAS	52
CÉLULAS ESTAMINAIS DERIVADAS DA MEDULA OSSEA.....	53
CÉLULAS ESTAMINAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO	54
CÉLULAS ESTAMINAIS DERIVADAS DO CORDÃO UMBILICAL	55
CÉLULAS ESTAMINAIS PLURIPOTENTES INDUZIDAS	56
CÉLULAS ESTAMINAIS DERIVADAS DO PERIÓSTEO.....	57
CÉLULAS PROGENITORAS DERIVADAS DA TRABÉCULA ÓSSEA	58
FOSFATO DE CÁLCIO(CAP)	60
HIDROXIAPATITE (HA).....	62
FOSFATO CÁLCIO BIFÁSICO (BCP)	62
FOSFATO OCTACÁLCIO(OCP)	63
SULFATO DE CÁLCIO(CS).....	63
METAIS.....	64
POLIMEROS	65
BIOVIDRO ACTIVO	67
DENTINA.....	67
CONCLUSÃO	69
BIBLIOGRAFIA	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Corte transversal de um osso mandibular (Nancy, 2012).	13
Figura 2 - Processo de formação do colagénio (T. Ferreira, Silva, Lúcia, & Penna, 2012).	18
Figura 3 – Isomerização do C-Telopéptido, adaptado de (Garnero, 2015)	20
Figura 4 - Diferença da força de torção do colagénio homotrimérico e heterotrimérico. Adaptado de (S. W. Chang et al., 2012)	21
Figura 5 - Sialoproteína óssea (Fujisawa & Tamura, 2012)	23
Figura 6 - Osteopontina (Fujisawa & Tamura, 2012).	24
Figura 7 - Ligação da nucleação dos iões cálcio e fosfato às proteínas ácidas da matriz (Fujisawa & Tamura, 2012).	27
Figura 8 - Crescimento do cristal de hidroxiapatite, em função das proteínas ácidas da matriz (OC e DMP1) (Fujisawa & Tamura, 2012).	28
Figura 9 - Diferenciação das células do tecido ósseo. Adaptado de (Walsh et al., 2006).	28
Figura 10 - Diferenciação osteoclástica (D. Burr & Matthew, 2013).	31
Figura 11 - Ossificação endocondral (Hadjizadeh & Doillon, 2010)	33
Figura 12 - Quatro fases da remodelação óssea. 1) Início da remodelação; 2) Reabsorção óssea; 3) Formação do novo osso; 4) Fim da remodelação (Feng & McDonald, 2011).	34
Figura 13 - (A) Interação RANK/RANKL e (B) Interação OPG/RANKL. Adaptado de (Josse, 2009)	36
Figura 14 - Fase inflamatória, caracterizada pela presença de hematoma (Mescher, 2013).	41
Figura 15 - Fase da formação do calo mole de cartilagem (Mescher, 2013).	42
Figura 16 - Fase de formação do calo ósseo rígido (Mescher, 2013).	43
Figura 17 - Remodelação do novo osso, estando finalizada a cicatrização completa da fratura (Mescher, 2013).	44
Figura 18 - Cicatrização direta. (A) Cicatrização por contacto e (B) Cicatrização por intervalo. Adaptado de (Claes et al., 2012)	45
Figura 19 - Componentes da regeneração óssea guiada (Bhattacharya, Ghayor, & Weber, 2016)	51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos enxertos, adaptado de (Shibuya & Jupiter, 2015).	50
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α -1 – alfa1

α -2 – alfa2

α -CTX – telopéptido C Normal

β -CTX – telopéptido C Isomerizado

β -TCP – fosfato β -Tricálcico

AGE – produtos finais de glicação avançada

ARG-GLY-ASP – sequência de aminoácidos Arginina-Glicina-Aspartato

ASP-GLY – sequência de aminoácidos Aspartato-Glicina

BCP – fosfato cálcio bifásico

bFGF – fator básico do crescimento dos fibroblastos

BGP – proteína Gla óssea

BM-40 – proteína base da membrana 40

BMP-2 – proteína morfogénica óssea 2

BMSC – células estaminais da medula óssea

BMU – unidade básica multicelular

BRC – compartimento remodelação óssea

CaP – fosfato cálcio

CFU-GM – unidade formadora das colónias dos granulócitos/macrófagos

CPC – cimento fosfato de cálcio

CS – sulfato cálcio

C-Terminal – terminal carboxilo

CTX – telopéptido C

DBM – matriz óssea desmineralizada

DM – diabetes mellitus

DMP-2 – proteína da matriz dentinária 2

DPP – fosforina dentinária

FDJR-1 – recetor derivado das células dentriticas foliculares 1

GAG – glicosaminoglicanos

Gly-X-Y – sequência de aminoácidos Glicina-X-Y

GM-CSF – fator estimulador de colónias de granulócitos/macrófagos

GMP – células progenitoras dos granulócitos/macrófagos

HA – hidroxiapatite
IL-1 – interleucina 1
IL-3 – interleucina 3
IL-6 – interleucina 6
M-CSF – fator de estimulação de colónias de macrófagos
MMP – metaloproteinases
MSC – célula estaminais mesenquimais
N-Terminal – terminal amino
NTX – telopéptido N
NCP – proteínas não colagénicas
OC – osteocalcina
OCIF – fator inibidor da osteoclastogénese
OCP – fosfato octacálcio
ODAR – recetor de ativação de diferenciação dos osteoclastos
OPG – osteoprotegerina
OPGL – ligando osteoprotegerina
OPN – osteopontina
PCL – policaprolatona
PGA – ácido poliglicólico
PLA – ácido polilático
PTH – hormona paratiroide
RANK – recetor ativador do fator nuclear K- β
RANKL – ligando do recetor ativador do fator nuclear k- β
RGD – Sequência de ligação à integrina
TFG- β - fator de crescimento transformador β
TNF/TRANCE – fator necrose tumoral
TNFRSF/TRANCE-R – superfamília dos recetores dos fatores de necrose tumoral
TR1 – tropina redutase 1
VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

INTRODUÇÃO

De todos os órgãos do corpo humano, o osso tem um papel fisiológico de grande importância, a nível do suporte mecânico, proteção e homeostasia mineral. Este tecido conjuntivo mineralizado é constituído por duas camadas, o osso cortical e o osso trabecular ou esponjoso (D. Burr & Matthew, 2013).

O osso cortical é a fração mais externa e mais densa, cuja função é aguentar doses de força de carga maiores (D. Burr & Matthew, 2013; Mescher, 2013). Já o osso esponjoso ou trabecular, embora seja mais poroso e não tão denso, tem um importante papel que é direccionar as forças de stress para o osso cortical, a fim de dissipar essa energia (D. Burr & Matthew, 2013). As frações ósseas têm o importante papel de proteção, principalmente a nível dos órgãos. São exemplos o caso da cabeça ou das costelas, cuja organização óssea está concebida a fim de absorver a energia de impacto e dispersar a mesma.

Ainda na camada do osso trabecular, temos a cavidade medular constituída pela medula óssea e que também vai atuar no metabolismo ósseo, durante o crescimento e desenvolvimento (D. Burr & Matthew, 2013; Mescher, 2013).

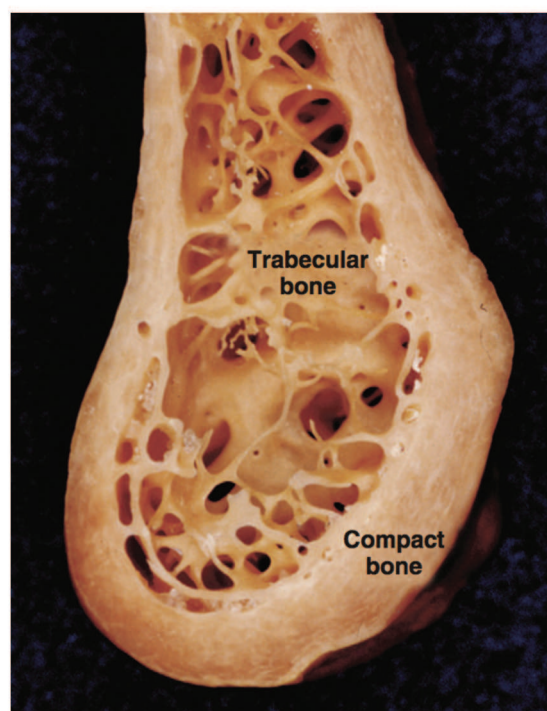


Figura 1 - Corte transversal de um osso mandibular (Nancy, 2012).

O tecido ósseo é composto por uma matriz inorgânica, correspondendo a 65% da matriz óssea, 25% de matriz orgânica e 10% de água. A matriz orgânica tem na sua composição 90% de colagénio tipo I e 10% de proteínas não colagénicas (D. Burr & Matthew, 2013). As fibras de colagénio são muito importantes, pois vão ser a primeira linha da estrutura óssea, sendo que uma qualquer perturbação na sua formação pode comprometer toda a estrutura óssea (D. B. Burr & Allen, 2014; Florencio-Silva, Sasso, Sasso-Cerri, Simões, & Cerri, 2015; Garnero, 2015). As proteínas não colagénicas vão ser importantes na mineralização, estabelecendo uma ligação ao colagénio e aos cristais de hidroxiapatite (D. B. Burr & Allen, 2014; Fujisawa & Tamura, 2012; Mescher, 2013; Morgan, Poudarik, & Vashishth, 2015). A matriz inorgânica, constituída por iões cálcio, fosfato e carbonato, vão nuclear e cristalizar, formando os cristais de apatite, o mineral constituinte do osso (D. B. Burr & Allen, 2014; Clarke, 2008; Gartner & Hiatt, 2010; Mescher, 2013). A água, não menos importante, circunda o complexo colagénio-mineral e está presente na componente vascular, permitindo a difusão dos iões e de outros componentes importante ao metabolismo ósseo (D. B. Burr & Allen, 2014).

A osteogénese, sendo o processo pelo qual é formado o osso, consiste em dois processos, nomeadamente, a ossificação endocondral e a ossificação intramembranosa. Na ossificação endocondral, há a formação de cartilagem, com posterior reabsorção e formação do osso propriamente dito. Já na ossificação intramembranosa, não há formação de cartilagem, mas sim pequenos centros de ossificação com posterior formação de osso (Berendsen & Olsen, 2015; D. B. Burr & Allen, 2014; Hadjizadeh & Doillon, 2010; Mescher, 2013). Após a formação do osso, o mesmo é sujeito a forças de carga que danificam e criam microfraturas. Sendo necessário recorrer ao processo de remodelação óssea, constituído pela reabsorção do tecido lesado, orquestrada pelos osteoclastos e a posterior formação do novo tecido ósseo, concebida pelos osteoblastos (D. Burr & Matthew, 2013; Eriksen, 2010; Feng & McDonald, 2011; Mescher, 2013). Tanto a reabsorção óssea como a formação do osso envolvem fatores, que despoletem a ativação, proliferação e diferenciação dos osteoclastos e osteoblastos, sendo necessário que estes dois processos estejam em sintonia, a fim de o osso reabsorvido ser igual ao osso formado (D. Burr & Matthew, 2013; Eriksen, 2010).

O sistema RANK/RANKL/OPG é um sistema importante, pois está bem organizado com fatores (RANKL e OPG) e os seus respetivos recetores (RANK) presentes nas membranas do osteoclastos e osteoblastos, que vão permitir que a

remodelação óssea esteja em equilíbrio (W. Liu & Zhang, 2015; Sigl & Penninger, 2014; Walsh & Choi, 2014).

Apesar da remodelação e da reparação das microfraturas, por vezes a acumulação destas ou uma força exercida que seja superior à resistência do osso, leva a fraturas maiores com quebra óssea (Giannoudis et al., 2015; Oryan, Monazzah, & Bigham-Sadeh, 2015a). No entanto o nosso sistema está preparado para responder a esses estímulos e regenerar o osso fraturado, através de dois tipos de regeneração óssea, a cicatrização direta e a indireta. Na cicatrização direta, as faces das fraturas unem-se, com ajuda cirúrgica, para que a homeostasia seja reestabelecida e o osso recupere a sua estrutura e propriedades (Claes, Recknagel, & Ignatius, 2012; Sathyendra & Darowish, 2013). Já na cicatrização indireta, sendo o método de regeneração mais comum, é necessária a imobilização do membro e a própria zona da fratura passa por processos diferentes da anterior (Gibon, Lu, Nathan, & Goodman, 2017; Marsell & Einhorn, 2011a; Sathyendra & Darowish, 2013).

Por vezes, em caso de grandes fraturas com perda óssea, é necessário a intervenção de uma técnica de regeneração guiada, com uso de enxertos, seja com autoenxertos ou aloenxertos. Os autoenxertos são os mais usados no entanto apresentam problemas ao nível do local dador, enquanto o aloenxerto pode apresentar problemas imunológicos com possível rejeição do enxerto

A engenharia de tecidos é uma metodologia na área da regeneração óssea, mais recente com o objetivo de formar novo tecido ósseo, sem as desvantagens dos enxertos. A estratégia da engenharia de tecidos ósseos engloba a componente celular, com propriedades osteogénicas e a componente das matrizes compostas de biomateriais, com características biocompatíveis com o nosso organismo (Campana et al., 2014; Chiarello et al., 2013; Gusić et al., 2014). Contudo, são necessários mais estudos na área da regeneração óssea, a fim de encontrar um biomaterial que tenha as características de biocompatibilidade, osteogénico, osteoindutivo, vasculogénico e com propriedades mecânicas desejadas para cada osso (Szpalski, Wetterau, Barr, & Warren, 2011).

DESENVOLVIMENTO

MATRIZ ÓSSEA

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo mineralizado dinâmico, que está permanentemente a ser remodelado e que permite que a sua própria homeostasia seja mantida pelas células que o constituem. A matriz extracelular óssea tem uma constituição complexa e organizada, sendo em 90% constituída por proteínas colagénicas, predominante por colagénio tipo I. O suporte mecânico e a homeostasia mantida deve-se predominantemente à matriz extracelular óssea, pois acredita-se que mudanças na sua constituição podem ter efeitos nefastos ao nível do próprio osso (Florencio-Silva et al., 2015).

Colagénio

A matriz orgânica do tecido ósseo é constituída cerca de 90% por colagénio, maioritariamente do tipo I mas também dos tipos III e V, e por uma pequena porção de proteínas não colagénicas (Garnero, 2015). O colagénio é a proteína fibrilar trimérica mais abundante nos mamíferos, existindo vinte e oito tipos, cujo fator comum é uma tripla hélice (Garnero, 2015). A variedade de colagénios devem-se a diversos fatores, nomeadamente a existência de diferentes cadeias alfa, existência de isoformas moleculares, estruturas supra moleculares e diferentes promotores (Ricard-Blum, 2011).

As cadeias alfa formam moléculas triméricas, que se entrelaçam entre si de maneira a formarem uma tripla hélice. As triplas hélices são constituídas por tripletos repetidos, estabilizadas por pontes de hidrogénio e ligações dissulfeto (Garnero, 2015; Gordon & Hahn, 2010; Ricard-Blum, 2011). A molécula de colagénio está organizada em estruturas hierárquicas e a sua síntese ocorre dentro da célula, sendo secretada por vesículas na forma de tropocolagénio. A sua síntese é composta pelas seguintes fases (figura 2): formação do procolagénio; formação do tropocolagénio; associação de tropocolagénio em fibrilhas e formação das fibras de colagénio. As cadeias de colagénio são sintetizadas nas células na forma de procolagénio, correspondendo a moléculas com uma região central colagénica, que apresenta o motivo G-X-Y e duas porções não colagénicas nas extremidades N e C terminal. Existe uma trimerização das porções não colagénicas (Propéptido carboxilo e propéptido amino) e, as porções de colagénio enrolam-se, formando uma tripla hélice, dando origem assim ao procolagénio. As porções peptídicas

não colagénicas, a N e C terminal, sofrem seguidamente hidrólise enzimática, originando o tropocolagénio. Os vários tropocolagénio vão ligar-se por ligações covalentes e pontes de hidrogénio, pelos péptidos dos outros tropocolagénios, agrupando-se em fibrilhas. Por fim, as fibrilhas agrupam-se para dar origem as fibras de colagénio. As fibras estão dispostas paralelamente e em escada, com intervalos regulares entre elas, sendo esses intervalos o local inicial da deposição mineral (Garnero, 2015).

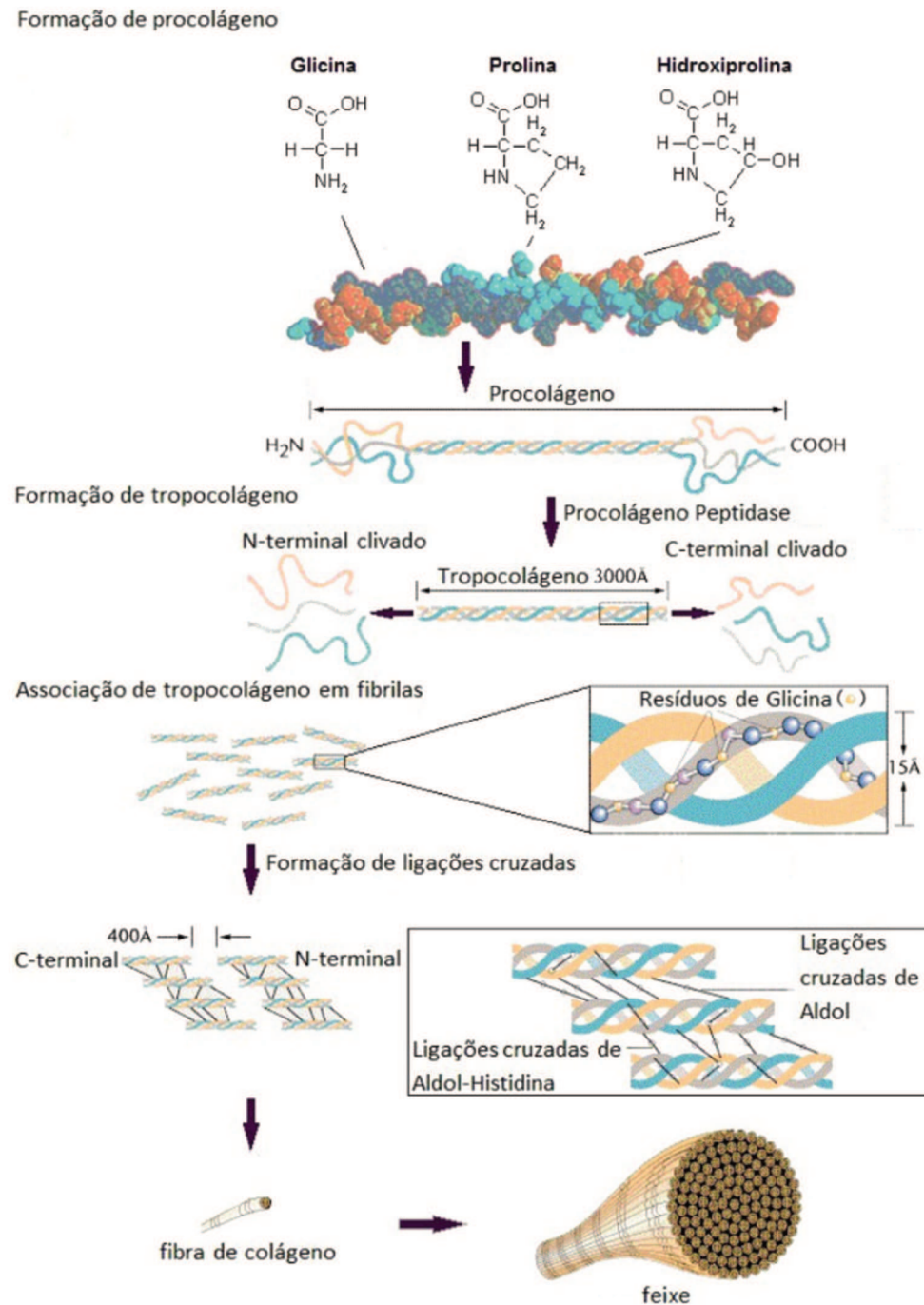


Figura 2 - Processo de formação do colagénio (T. Ferreira, Silva, Lúcia, & Penna, 2012)

O colagénio tipo I é um heterotrímero composto por duas cadeias idênticas $\alpha 1$ e uma cadeia diferente $\alpha 2$ e tem na sua composição tripletos repetidos de Glicina-X-Y (Gly-X-Y). A glicina é o aminoácido que se repete em cada triplete, característica importante para a estabilidade do colagénio, visto que é o aminoácido mais pequeno e que na sua cadeia lateral possui um hidrogénio, sendo este importante na formação de pontes de hidrogénio entre outros grupos péptidos e ainda, o facto de ser o mais pequeno, permite que se consiga rodar a hélice. O X e o Y, podem ser quaisquer aminoácidos, mas os mais comuns são prolina e hidroxiprolina, (Concu, Podda, Gonzalez-Diaz, & Shen, 2011).

O colagénio tem funções importantes ao nível das propriedades mecânicas, organizacionais e estruturais (Garnero, 2015; Ricard-Blum, 2011). A resistência óssea está diretamente ligada às propriedades do colagénio, sendo que alterações à normalidade desta proteína podem influenciar negativamente as propriedades mecânicas do osso, como é o caso da isomerização do C-telopéptido, a presença de homotrímeros, a orientação das fibrilhas e o intervalo entre as fibrilhas (Garnero, 2015). A isomerização é o processo em que as moléculas mantêm a sua fórmula química e mudam a sua estrutura, ou seja, quando existe a mudança de um grupo químico de uma posição para outra na molécula (Vasseur, Bruffaerts, & Marek, 2016).

Os telopeptidos são fragmentos peptídicos não helicoidais, que contêm os terminais C (CTX) e N (NTX) das cadeias de colagénio. A isomerização do telopeptido C do colagénio tipo I pode causar alterações nas propriedades da molécula.

Neste processo de isomerização, ilustrado pela figura 3, existe uma translocação na sequência de aminoácido AHDGGR, no ácido aspártico do CTX, originando uma β -isomerização da cadeia $\alpha 1$ do CTX. A cadeia normal é chamada de α -CTX e o isomero é denominado de β -CTX, sendo que a isomerização vai afetar a ligação do ácido aspártico e glicina (Asp-Gly), estando inicialmente a ligação destas no grupo carboxilo na posição alfa e, posteriormente sendo transposta para a posição beta. No seu estado normal, ambas as cadeias se encontram em equilíbrio e, o aumento do nível de uma destas cadeias poderá levar ao desenvolvimento de uma doença óssea (Garnero, 2015).

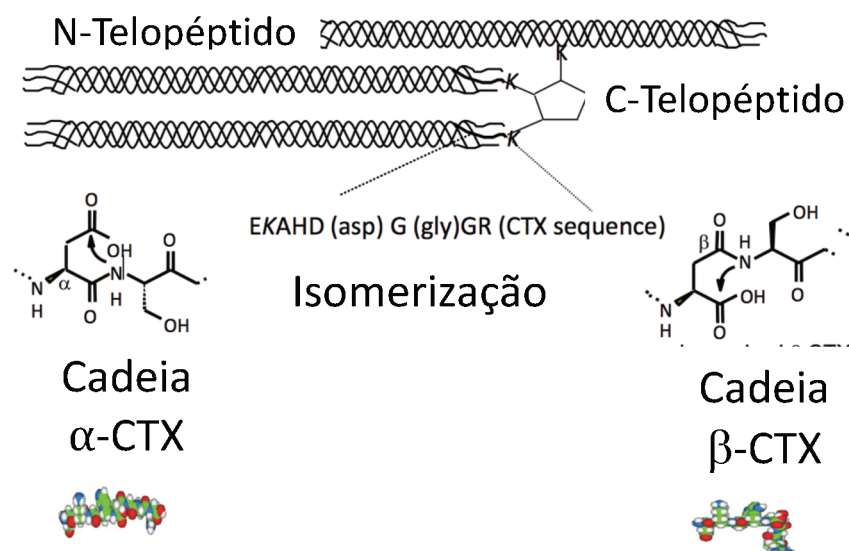


Figura 3 – Isomerização do C-Telopéptido, adaptado de (Garnero, 2015)

No caso da doença de Paget, o desequilíbrio acontece com o aumento das cadeias α -CTX e por outro lado, na *osteogénese imperfecta* o aumento dá-se ao nível das cadeias β -CTX (Garnero, 2015).

O colagénio homotrimérico consiste em três cadeias $\alpha 1$, influenciando a integridade mecânica e estabilidade do colagénio, sugerindo que a cadeia $\alpha 2$ presente no colagénio tipo I, vai garantir melhores propriedades mecânicas e maior estabilidade (Garnero, 2015). A isoforma colagénica homotrimérica pode ser encontrado em tecidos embrionários, em fibrose e em pacientes que sofram de cancro (S. W. Chang, Shefelbine, & Buehler, 2012; Garnero, 2015). Estudos científicos (Makareeva et al., 2010) indicaram a presença do homotrímico em pacientes com carcinomas, sendo este secretado pelas células cancerígenas. Uma característica desta isoforma molecular do colagénio é a resistência colagenolítica das metaloproteinases de matriz (MMP), que ajudam na proliferação e migração das células cancerígenas.

Em 2006, Orgel e os seus colaboradores, realizaram estudos em ratos com uma doença de fragilidade óssea, a *osteogénese imperfecta (oim)*, que se caracteriza pela presença de homotrímeros de colagénio compostos por três cadeias $\alpha 1$. Os investigadores, compararam este modelo com outro modelo de ratos com colagénio heterotrímico composto por 2 cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$. O estudo mostrou que os ratos com fenótipo *oim* são mais frágeis e menos resistentes, garantindo assim propriedades mecânicas mais fracas comparativamente aos ratos normais. Tal observação foi atribuída

ao facto de haver uma deposição mineral anormal, resultando numa interação mineral-matriz incompetente (Orgel, Irving, Miller, & Wess, 2006).

Outro estudo, ilustrado pela Figura 4, demonstra que o homotrímero tem um ângulo de torção maior que o colagénio heterotrímérico. Tal característica vai afetar a distância entre as moléculas de colagénio nas fibrilhas, diminuindo a força das ligações covalentes e, conseqüentemente, reduzindo as forças mecânicas (S. W. Chang et al., 2012).

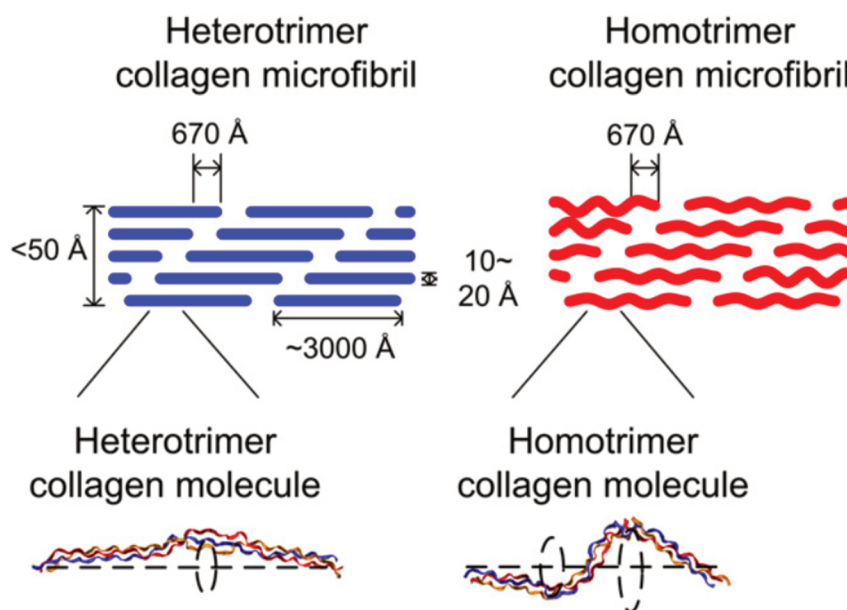


Figura 4 - Diferença da força de torção do colagénio homotrimérico e heterotrimérico. Adaptado de (S. W. Chang et al., 2012)

A orientação das fibrilhas de colagénio também vai influenciar as propriedades mecânicas do osso. As fibrilhas devem ser direcionadas no sentido das forças de carga, que no caso do fémur, estão orientadas na vertical (Viguet-Carrin, Garnero, & Delmas, 2006). Em 2005, Silva e os seus colaboradores fizeram um estudo comparativo entre murganho com senescência acelerada (SAMP6) e murganhos normais (SAMR1). Os murganhos SAMP6 mostraram maior fragilidade óssea, devido a uma alteração do volume e orientação do colagénio, levando a um enfraquecimento da matriz óssea (M. J. Silva et al., 2005).

O *D-spacing* é o espaço entre as fibrilhas de colagénio, que corresponde a um valor de 67 nm. Pensa-se que se houverem valores fora do normal, a fibrilha pode ficar mais flexível e então perder propriedades mecânicas, influenciando a força de carga do osso (Garnero, 2015; Wallace et al., 2010).

Proteínas não colagénicas (NCP)

As proteínas não colagénicas (NCP) fazem parte da matriz extracelular orgânica do osso e exibem vários papéis, determinantes na qualidade do osso. A mineralização da matriz óssea, a qualidade e as propriedades mecânicas são influenciadas pela NCP (Morgan et al., 2015). Investigadores afirmam que as proteínas não colagénicas da matriz podem atuar como uma ligação entre a matriz orgânica e a matriz inorgânica do osso e, ao mesmo tempo, como inibidoras da mineralização (Fujisawa & Tamura, 2012; Poundarik et al., 2012). As proteínas que fazem parte deste tipo são a sialoproteína óssea, a osteocalcina, o biglicano, a fibrilina-2, a osteonectina (Morgan et al., 2015) e a osteopontina (Fujisawa & Tamura, 2012).

Sialoproteína óssea

A sialoproteína óssea é uma das glicoproteínas ácidas da matriz extracelular dos tecidos mineralizados e um membro da família das proteínas SIBLING (*Small Integrin-Binding Ligand N-ligand glycoprotein*) (Fujisawa & Tamura, 2012; Holm, Aubin, Hunter, Beier, & Goldberg, 2015). Na sua composição tem oligossacáridos, contendo ácidos siálicos e aminoácidos fosforilados e sulfatados (Fujisawa & Tamura, 2012). Sabe-se que é uma das principais proteínas não colagénicas e, que as suas funções principais são a promoção da biomineralização e o desenvolvimento osteoblástico (Holm et al., 2015; L. Xu, Anderson, Lu, & Wang, 2007).

Tem como características a sequência de RGD de ligação à integrina, composto por arginina-glicina-aspartato (ARG-GLY-ASP), presente no terminal carboxilo, com a função de mediar a ligação celular dos osteoblastos (Bernards, Qin, & Jiang, 2008; Fujisawa & Tamura, 2012). Adicionalmente, na sua composição existem sequências de ácido glutâmico presentes no terminal amino, como mostra a figura 5, com atividade *in vitro* na nucleação da hidroxiapatite (Fujisawa & Tamura, 2012; Tye et al., 2003). A proteína tem afinidade com o colagénio, ligando-se às fibrilhas, nomeadamente nas “*hole zones*”, o que leva a pensar que a sialoproteína óssea é muito importante na mineralização, visto ter também afinidade com a hidroxiapatite (Fujisawa & Tamura, 2012)

Num estudo feito em 2008, por Malaval e os seus colaboradores, foi feita a comparação entre ratos com ausência de sialoproteína óssea (-/-) e ratos normais (WT). O estudo demonstrou que os ratos (-/-) apresentaram desmineralização óssea em fetos e jovens adultos, mas não em ratos mais velhos. Estes jovens adultos apresentavam osso

cortical mais fino, mas maior volume de osso trabecular, confirmando uma redução na formação óssea, em ossos de ratos mais novos. Este estudo leva a crer que a sialoproteína possa ter um importante papel na osteogênese.

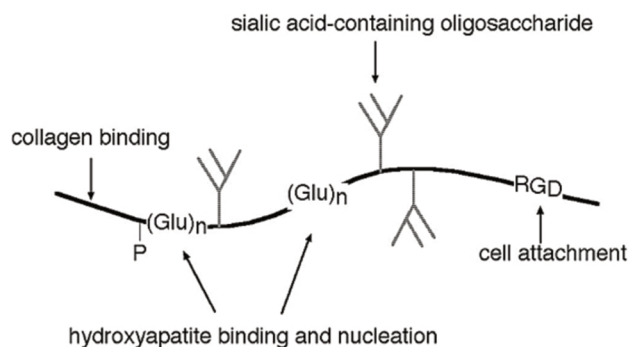


Figura 5 - Sialoproteína óssea (Fujisawa & Tamura, 2012)

Osteocalcina (OC)

A osteocalcina ou “*Bone Gla protein (BGP)*” é uma das proteínas não colagênicas mais abundantes na matriz óssea, agindo não só a nível ósseo, como também a nível metabólico, sendo produzida pelos osteoclastos (Arteaga-Solis et al., 2011; Morgan et al., 2015) e odontoblastos (Fujisawa & Tamura, 2012). Tem três resíduos ácidos de ácido gama-carboxi glutâmico, que apresentam grande afinidade com os íons cálcio.

Alguns autores defendem que esta proteína é inibidora da formação óssea (Fujisawa & Tamura, 2012). Ducy e os seus colaboradores, em 1996, comparando ratos com ausência de osteocalcina e ratos com parâmetros normais, observaram que os ratos sem expressão da proteína tinham maior formação de osso. Ambos os autores concluem que a osteocalcina funciona como um inibidor da formação óssea, devido à ligação entre os resíduos e a face do cristal de hidroxiapatite, impedindo a ligação dos íons cálcio livres (Ducy et al., 1996; Fujisawa & Tamura, 2012).

Osteopontina (OPN)

A osteopontina é uma fosfoproteína glicosilada do osso, rica em aminoácidos fosforilados e oligossacáridos, que contêm ácido siálico, com a sequência de ligação celular RGD e, sequências de ácido aspártico na sua cadeia, tal como descrito na figura 6 (Fujisawa & Tamura, 2012).

A osteopontina tem afinidade com a hidroxiapatite, havendo estudos que comprovam a sua função promotora da mineralização e, outros que evidenciem a inibição

da mineralização (Fujisawa & Tamura, 2012; Gericke et al., 2005). A OPN está presente na superfície da matriz óssea e é reconhecida pelas integrinas dos osteoclastos, servindo de ligação entre estas células ósseas e a matriz (Fujisawa & Tamura, 2012). Num estudo realizado por Rittling e os seus colaboradores, em 1998, foi visto que em ratos com ausência de expressão de OPN, havia formação óssea normal. Por outro lado, Boskey e os seus colaboradores, em 2002 observaram que os ratos sem expressão de osteopontina, apresentaram um aumento mineral, originando cristais de hidroxiapatite maiores. Os resultados recolhidos levaram os investigadores a concluir que a osteopontina pode ser um inibidor da mineralização (Boskey, Spevak, Paschalis, Doty, & McKee, 2002).

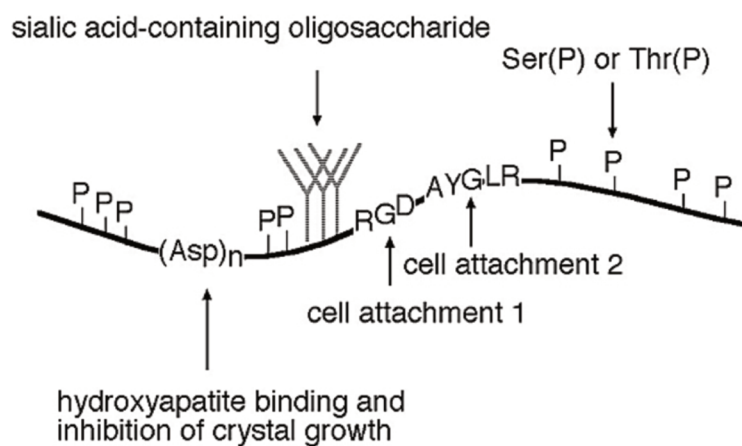


Figura 6 - Osteopontina (Fujisawa & Tamura, 2012)

Biglicano

Os biglicanos fazem parte da família SLRP (Small Leucine Rich Proteoglican), que podem afetar a estrutura óssea (Morgan et al., 2015). Ratos com ausência desta proteína exibem diminuição da massa e do comprimento dos ossos, devendo-se este facto à inibição da atividade osteoblástica.

A ausência dos biglicanos pode ainda dar origem a uma redução da força e da dutibilidade do osso, comparativamente com os ratos que expressam esta proteína (T. Xu et al., 1998). Já Sugar e os seus colaboradores, em 2003 sugerem que a decorina e o biglicano, ambos pertencentes à família das SLRP, possuem na sua estrutura cadeias glicosaminoglicanos (GAG). As cadeias GAG têm afinidade tanto com a hidroxiapatite como com o colagénio e, se estas se ligarem à hidroxiapatite, atuam como inibidores da formação dos seus cristais. Por outro lado, se se ligarem ao colagénio, existe possibilidade de formação de cristais de hidroxiapatite, para posterior mineralização. Os autores

concluem que tanto a decorina como o biglicano, podem ser tanto promotores como inibidores do processo de mineralização (Sugars et al., 2003).

Fibrilina-2

A fibrilina-2 é uma glicoproteína, que tem um papel importante na formação do osso, influenciando as suas propriedades mecânicas (Arteaga-Solis et al., 2011; Morgan et al., 2015).

Foi realizado um estudo comparativo entre ratos com ausência da fibrilina-2 e ratos com expressão da mesma. Nistala e os seus colaboradores, em 2010 notaram que a biodisponibilidade do fator de crescimento TFG- β ficava diminuída em ratos com ausência da glicoproteína e, por conseguinte, a proliferação dos osteoblastos também diminuía, influenciando negativamente as propriedades e morfologia do osso. Os resultados mostram uma diminuição de densidade mineral e do tamanho ósseo e, ainda devido à falta de osteoblastos, uma redução na produção de colagénio (Nistala et al., 2010).

Osteonectina

A osteonectina, também denominada de SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich Cysteine) ou BM-40 (Basement Membrane Protein 40) (Rosset & Bradshaw, 2016a) é uma proteína não colagénica muito abundante na matriz extracelular, que é secretada pelos osteoblastos (Morgan et al., 2015; Rosset & Bradshaw, 2016a). A proteína em questão pode influenciar o processo de formação óssea, através de vários mecanismos, como a regulação do procolagénio, mineralização e a diferenciação dos osteoblastos e osteoclastos (Rosset & Bradshaw, 2016a).

Uma característica que define a osteonectina é o fato de possuir domínios de ligação com a hidroxiapatite e o colagénio presente na matriz, considerando-se que esta ligação pode promover a mineralização óssea (Rosset & Bradshaw, 2016b) ausência da expressão desta proteína demonstra uma diminuição da quantidade de colagénio tipo I, sugerindo que SPARC tem um papel fundamental na produção ou deposição de colagénio (Bradshaw, 2009; Rosset & Bradshaw, 2016a).

Delany e os seus colaboradores, em 2003 observaram em ratos com ausência de expressão de osteonectina, que estes tinham um número reduzido de células osteoblásticas. Adicionalmente, a não expressão do gene desta proteína pode ser um

indicador de uma doença óssea, como a osteogénese imperfecta, osteopenia ou osteoporose (Delany et al., 2000; Delany, McMahon, Powell, Greenberg, & Kurland, 2008; Fedarko, Sponseller, & Shapiro, 1996; Mendoza-Londono et al., 2015).

Matriz inorgânica

A matriz inorgânica do osso é maioritariamente composta por cristais de hidroxiapatite, sendo a sua constituição química $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, onde estão presentes o maior número de cálcio e fosforo (Gartner & Hiatt, 2010). Ainda fazem parte, em proporções mais pequenas, carbonato de magnésio, iões sódio e potássio. Os cristais de hidroxiapatite existem na natureza, no entanto os cristais presentes no osso são mais pequenos e solúveis (Clarke, 2008). Atraem a água e formam uma concha de hidratação, que irá facilitar a troca de iões com o fluido extracelular (Gartner & Hiatt, 2010), permitindo assim que estes participem no metabolismo óssea (Clarke, 2008).

A matriz mineral vai dar ao osso propriedades de rigidez mecânica e força de carga (Clarke, 2008), estando estes minerais de hidroxiapatite inseridos nos intervalos das fibras do colagénio tipo I (Gartner & Hiatt, 2010).

Mineralização

A mineralização envolve duas etapas, sendo a primeira parte onde ocorre a nucleação precedida da formação do cristal (Fujisawa & Tamura, 2012; Landis & Jacquet, 2013). Uma vez formados os núcleos com os iões cálcio e fosfato, a cristalização é iniciada e alastra-se por toda a matriz orgânica.

A nucleação é a acumulação de iões sendo preciso superar a energia de barreira de ativação, devendo esta ser maior do que a energia necessária à libertação dos iões e, é possível reduzir essa energia baixando a energia interfacial. A redução da energia inteterfacial é conseguida devido às interações dos componentes orgânicos e inorgânicos com as proteínas da matriz. Os clusters vão ser aglomerados de moléculas, que neste caso vão ligar-se aos iões cálcio, conferindo carga negativa. Tais aglomerados são atraídos para as “hole zones” de maneira a que haja nucleação da hidroxiapatite. A atracção destes clusters é conseguida devido às proteínas não colagénicas que se encontram à superfície do colagénio e, que irão atrair em conjunto os iões fosfato. Sendo assim, como ilustrado na Figura 7, o complexo proteína-cálcio-fosfato forma-se e, origina o núcleo de cristal.

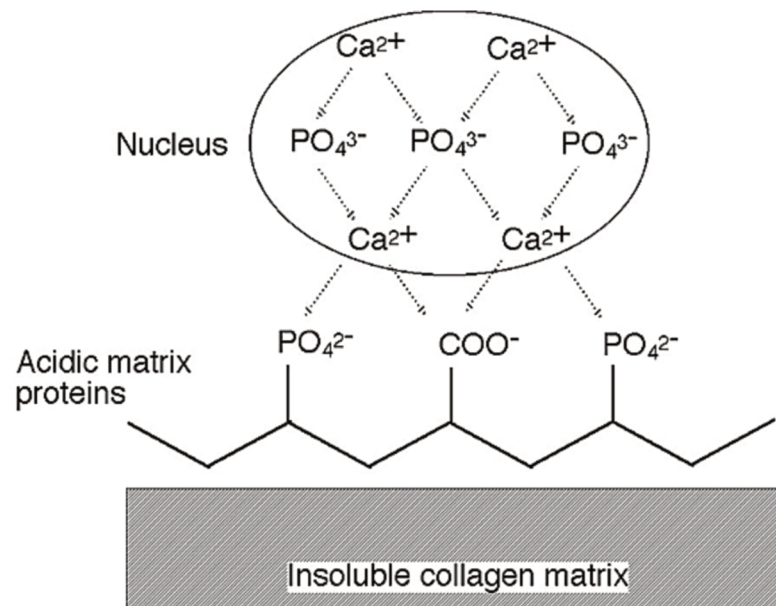


Figura 7 - Ligação da nucleação dos íons cálcio e fosfato às proteínas ácidas da matriz (Fujisawa & Tamura, 2012)

As proteínas ácidas da matriz, através da sua afinidade com os cristais de hidroxiapatite, direcionam a formação dos cristais pela matriz. Estas proteínas podem até ser inibidoras da mineralização, como por exemplo, a osteocalcina e fosfoproteína da dentina, que têm afinidade com as faces dos cristais de hidroxiapatite. As proteínas envolvidas na inibição são adsorvidas pelos cristais, impedindo a mineralização no sentido dessas proteínas, como mostra a figura 8 (Fujisawa & Tamura, 2012).

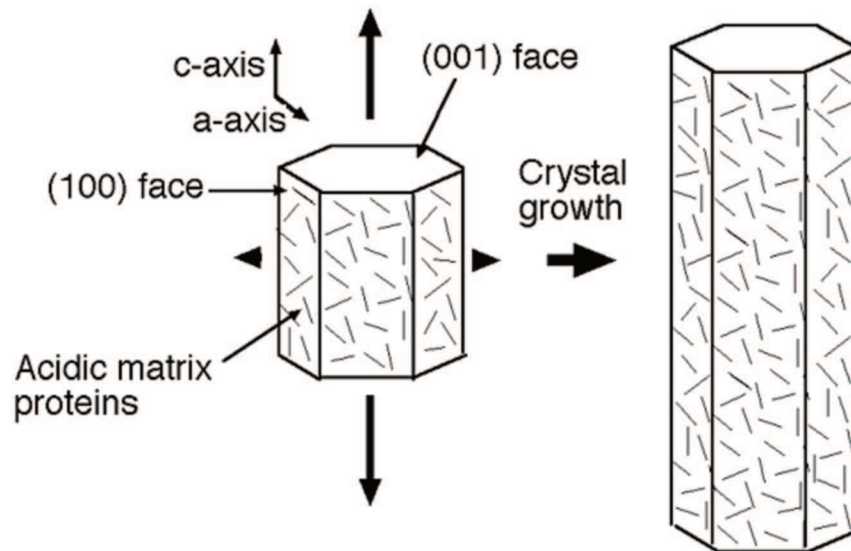


Figura 8 - Crescimento do cristal de hidroxiapatite, em função das proteínas ácidas da matriz (OC e DMP1) (Fujisawa & Tamura, 2012).

Componente celular

As células do osso podem ser divididas em quatro classes: as células osteoprogenitoras, os osteoblastos, os osteócitos, (estas três sofreram diferenciação das mesmas células mesenquimais primitivas) e os osteoclastos (diferenciados de células precursoras mieloides) (figura 9). As células ósseas têm funções essenciais na formação e manutenção do osso, sendo necessário que cada uma exerça a sua função, de maneira a manter a homeostase do osso (Gartner & Hiatt, 2010; Lowe & Stevens, 2005).

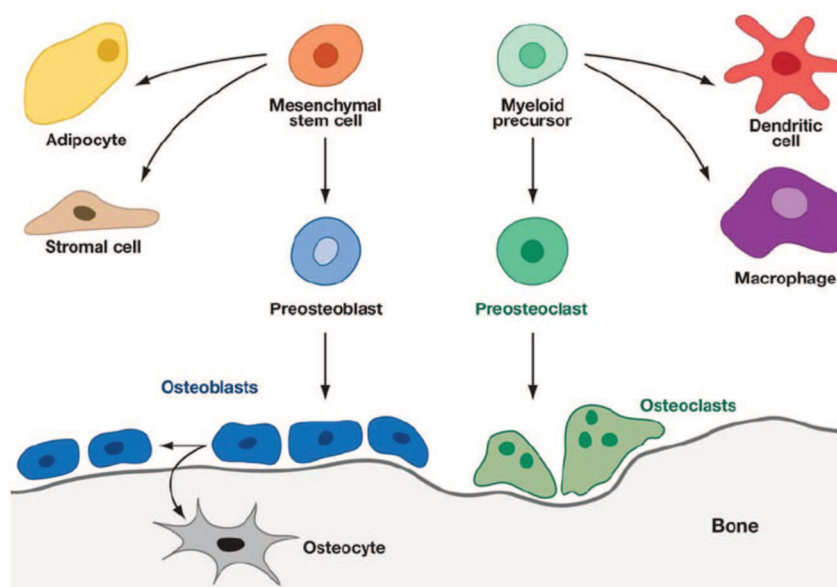


Figura 9 - Diferenciação das células do tecido ósseo. Adaptado de (Walsh et al., 2006).

Células osteoprogenitoras

As células osteoprogenitoras são as células tronco do osso e podem especializar-se em osteoblastos e, por sua vez, em osteócitos ou formarem mais células osteoprogenitoras, dependendo do estado de maturação do osso ou da existência de lesões ou fraturas (Gartner & Hiatt, 2010; Lowe & Stevens, 2005).

Quando o osso está inativo, ou seja, quando não há processos de formação ou de remodelação, estas células ficam inativas. Por outro lado, quando existe formação de osso ou remodelação, processos cujo o “*turn-over*” é alto, estas células estão ativas, e podem dividir-se e diferenciar-se em osteoblastos (Lowe & Stevens, 2005). Estas células encontram-se em todos os espaços livres do osso, nomeadamente no endóstio, na capa interna do perióstio e nas metáfises do osso (Fawcett, 1995).

Osteoblastos

Os osteoblastos são células cubóides e colunares, dispostas lado a lado na superfície da matriz óssea e com um citoplasma basófilo. Estas células secretam o osteóide, que compreende o colagénio tipo I, proteoglicanos, vesículas matriciais e outras moléculas. A célula vai endurecer e calcificar, formando a camada que fica entre a calcificação e a camada das próprias células osteoblásticas (Mescher, 2013).

As células osteoblásticas podem ainda produzir fatores de crescimento (Fawcett, 1995), um papel também de grande importância, devido ao fato de sinalizarem moléculas, como o ligando do recetor de ativação do fator nuclear kappa β (RANKL) e o fator de estimulação de colónias de macrófagos (M-CSF). E ainda tem participação na calcificação da matriz óssea (Gartner & Hiatt, 2010).

Com a formação do osso, os osteoblastos vão cessar a síntetização e secreção de proteínas, chegando a um estado de repouso, onde se diferenciam em osteócitos. Neste estado, existe uma camada ao longo do osso denominado de células de revestimento ósseo (Fawcett, 1995; Gartner & Hiatt, 2010). Uma característica muito importante nestas células é o facto de as membranas possuírem integrinas e recetores de hormona paratiroides (PTH). As integrinas têm a finalidade de promover a adesão dos osteoblastos à componente orgânica da matriz óssea e, os recetores das hormonas paratiroides quando ativados, secretam o RANKL e o fator de ativação dos osteoclastos (Gartner & Hiatt, 2010).

Osteócitos

Os osteócitos são células diferenciadas dos osteoblastos (Mescher, 2013) sendo as células que estão em maior número no osso (Feng & McDonald, 2011). Isto acontece, devido aos osteoblastos secretarem uma grande quantidade de matriz, ficando deste modo cercados pela matriz mineralizada e, por conseguinte, os osteoblastos diferenciam-se em osteócitos (Lowe & Stevens, 2005; Mescher, 2013).

Os osteócitos vão sofrer processos citoplasmáticos, cujo a finalidade é a formação de pequenos canais (canículos). Os canais vão contribuir para a comunicação com outros osteócitos e com as células do revestimento ósseo (osteoblastos), através de formações de pontos comunicantes, as “*gap junctions*”, permitindo a troca de iões entre os vasos sanguíneos e o fluido extracelular (Mescher, 2013).

Os osteócitos, comparativamente aos osteoblastos, apresentam complexo de Golgi mais pequeno, são mais achatados e o núcleo com cromatina mais condensada. Intervêm na regulação da remodelação óssea, por produção de citocinas e, também o facto de estarem ligados entre si e com outras células ósseas, sugere que tenham um papel importante na homeostasia do cálcio, como sensor de stress ósseo (Mescher, 2013).

Osteoclastos

Os osteoclastos são células grandes e multinucleadas, derivadas da linhagem dos monócitos/macrófagos. O seu papel principal é absorver matriz óssea durante a fase de crescimento ou remodelação óssea (Gartner & Hiatt, 2010; Mescher, 2013).

São estas células que durante a remodelação óssea, reabsorvem o osso antigo para posterior formação de novo osso (Fawcett, 1995). A sua localização fica em pequenas cavidades na superfície do osso, onde a reabsorção é maior, denominadas de lacunas de Howship (Gartner & Hiatt, 2010; Mescher, 2013).

Diferenciação osteoclástica

É na medula óssea que estão os primeiros precursores dos osteoclastos, sendo as unidades formadoras das colónias dos granulócitos/macrófagos (CFU-GM). Na medula óssea, as células estaminais hematopoiéticas dão origem às células progenitoras mielóides, devido à estimulação das interleucinas 3 (IL-3) e interleucinas 6 (IL-6). Com o fator estimulador de colónias de granulócitos/macrófagos (GM-CSF), as células

mielóides diferenciam-se em células progenitoras dos granulócitos/macrófagos (GMP). A diferenciação destas últimas em células da linhagem dos monócitos/macrófagos, é devido ao fator de estimulação das colônias de monócitos e macrófagos (M-CSF), sendo consideradas os precursores dos osteoblastos (D. B. Burr & Allen, 2014; F. Xu & Teitelbaum, 2013). De seguida, o RANKL vai ligar-se ao recetor RANK dos percursos dos osteoclastos e diferenciá-los em células osteoclásticas progenitoras mononucleadas. Por conseguinte, estas células fundem-se e tornam-se em osteoclastos multinucleados latentes, não se encontrando ainda ativos. Por fim, quando os osteoclastos latentes estiverem em contacto com a matriz óssea, vão induzir a polarização da membrana, passando desta forma a osteoclastos maduros, com capacidade de reabsorver a matriz óssea (D. B. Burr & Allen, 2014; F. Xu & Teitelbaum, 2013; Zou & Teitelbaum, 2010).

Quando os osteoclastos multinucleados latentes ficam em contato com a matriz óssea, é formado uma borda com pregas rodeadas de actina, criando um microambiente com pH ácido. A acidez é devido à secreção de collagenase, catepsina K e bombas de prótons, com finalidade de dissolver a hidroxiapatite e digerir as matrizes proteicas (Mescher, 2013).

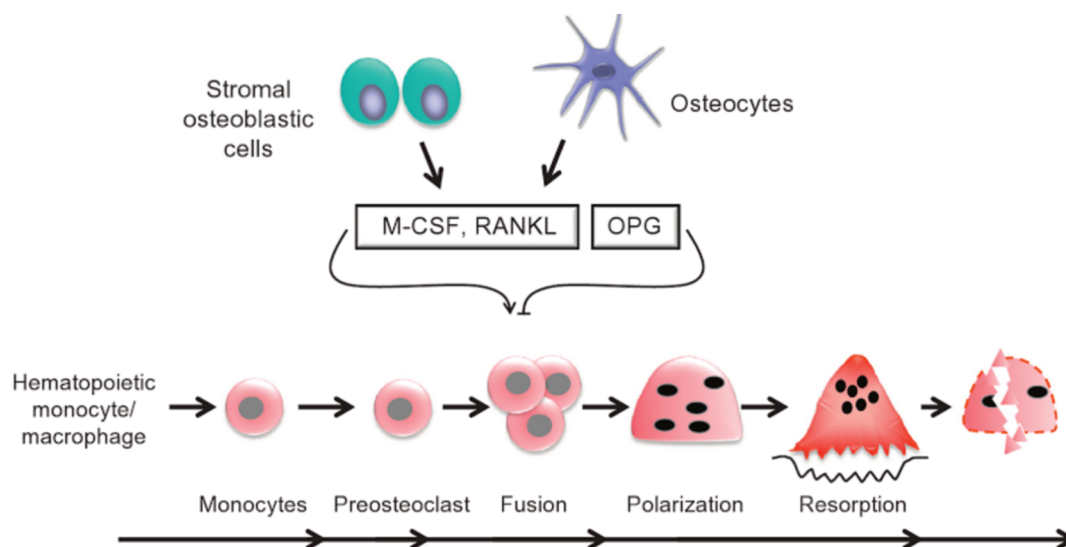


Figura 10 - Diferenciação osteoclástica (D. Burr & Matthew, 2013)

OSTEOGÉNESE

O desenvolvimento ósseo ocorre por dois processos: ossificação intramembranosa e ossificação endocondral (Berendsen & Olsen, 2015; Hadjizadeh & Doillon, 2010; Mescher, 2013). Na ossificação endocondral, as células mesenquimatosas diferenciam-se em condrócitos e estes formam um modelo cartilaginoso para o futuro osso. Já na

ossificação intramembranosa, as células mesenquimatosas vão diferenciar-se em osteoblastos e formam o novo osso (Berendsen & Olsen, 2015).

Ossificação endocondral

Na ossificação endocondral, há condensação das células mesenquimatosas e posterior diferenciação em condrócitos, que formam um modelo em cartilagem, através da secreção duma matriz cartilaginosa. Na periferia, as células sofrem diferenciação osteoblástica (Hadjizadeh & Doillon, 2010), de maneira a formar um colar ósseo denominado “*bone collar*” (Mescher, 2013). O colar ósseo impede a difusão do oxigénio, induzindo a produção de fosfatase alcalina pelos condrócitos, que sofrem hipertrofia. A hipertrofia dos condrócitos leva a que haja uma compressão no centro e comece a haver uma calcificação de fora para dentro. Os condrócitos sofrem apoptose e criam uma estrutura porosa, que irá servir para a penetração dos vasos (Mescher, 2013), trazendo as células osteoprogenitoras e osteoblastos para posterior formação dos centros de ossificação primários (Hadjizadeh & Doillon, 2010). O processo começa com a secreção de metaloproteinases da matriz (MMP), pelos condrócitos hipertróficos, que vão degradar a matriz rica em colagénio. Os osteoclastos, por sua vez, têm um papel importante na reabsorção desta matriz, promovendo a formação das cavidades medulares (Hadjizadeh & Doillon, 2010).

O que resta do modelo da cartilagem calcificada é parcialmente absorvida pelos osteoclastos. Ao mesmo tempo que no centro de ossificação primário é formado a cavidade medular, na epífise do osso, também é formado um centro de ossificação secundário. Entre estes dois centros existe uma zona que não é calcificada, mas sim constituída por tecido cartilaginoso, cuja responsabilidade é assegurar o crescimento do osso (Hadjizadeh & Doillon, 2010).

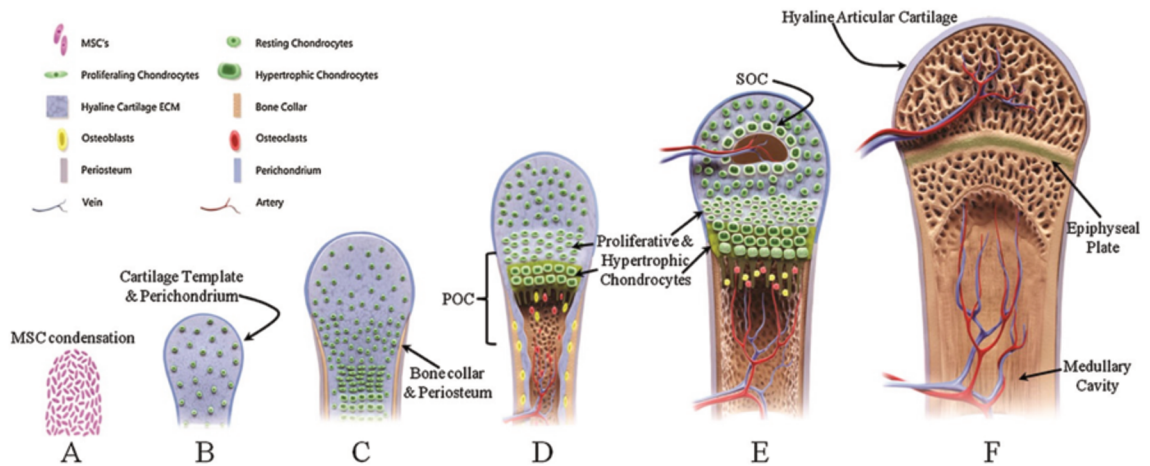


Figura 11 - Ossificação endocondral (Hadjizadeh & Doillon, 2010)

Ossificação intramembranosa

O processo de ossificação é ligeiramente diferente do outro processo anteriormente explicado. A ossificação intramembranosa vai dar origem principalmente aos ossos da cabeça e, começa por haver condensação de células mesenquimais, formando assim uma camada mesenquimatosa, à volta de uma rede de capilares. Na camada mesenquimatosa, há a formação de pequenos centros de ossificação, pelo qual se vai desenvolver a formação do futuro osso (Mescher, 2013).

As células mesenquimais diferenciam-se nas células osteoprogenitoras e estas vão proliferar e formar os osteoblastos. Como já dito anteriormente, os osteoblastos vão secretar o osteóide, que irá calcificar e formar as trabéculas dos futuros ossos. Continuamente, haverá a diferenciação dos osteoblastos em osteócitos e estes formam os seus canais citoplasmáticos, denominadas de canículos (Mescher, 2013).

Com a continuação da secreção matricial, calcificação e crescimento trabecular, há fusão dos diferentes centros de ossificação, produzindo o osso compacto. Deste modo, este tipo de ossificação envolve o osso esponjoso, a medula e vasos sanguíneos de maiores dimensões (Mescher, 2013).

Remodelação Óssea

O osso ao longo da sua vida vai sofrendo algumas microfraturas, devido às forças de carga que são empregues no dia a dia. Como tal, o osso é um tecido bastante dinâmico, reparando as suas fraturas através de dois processos, a reabsorção óssea e a formação óssea (Eriksen, 2010; Feng & McDonald, 2011). Ambas as fases têm de estar muito bem

sincronizadas e a quantidade de osso reabsorvida tem de ser igual à quantidade formada, porque qualquer desvio que haja, seja por aumento da reabsorção ou aumento da formação do novo osso, pode originar complicações (Eriksen, 2010).

No processo de remodelação estão envolvidas quatro tipo de células, sendo as células de revestimento ósseo os osteócitos, os osteoblastos e os osteoclastos. Para que se dê todo este processo, são precisas quatro fases, ilustradas pela figura 12 (Feng & McDonald, 2011):

- Fase 1: Ativação/Iniciação, sinalização e recrutamento dos precursores dos osteoclastos para o local específico.
- Fase 2: Reabsorção óssea e recrutamento das células estaminais mesenquimais e células osteoprogenitoras.
- Fase 3: Formação óssea, diferenciação dos osteoblastos e síntese do osteoide.
- Fase 4: Mineralização do osteoide e fim da remodelação óssea.

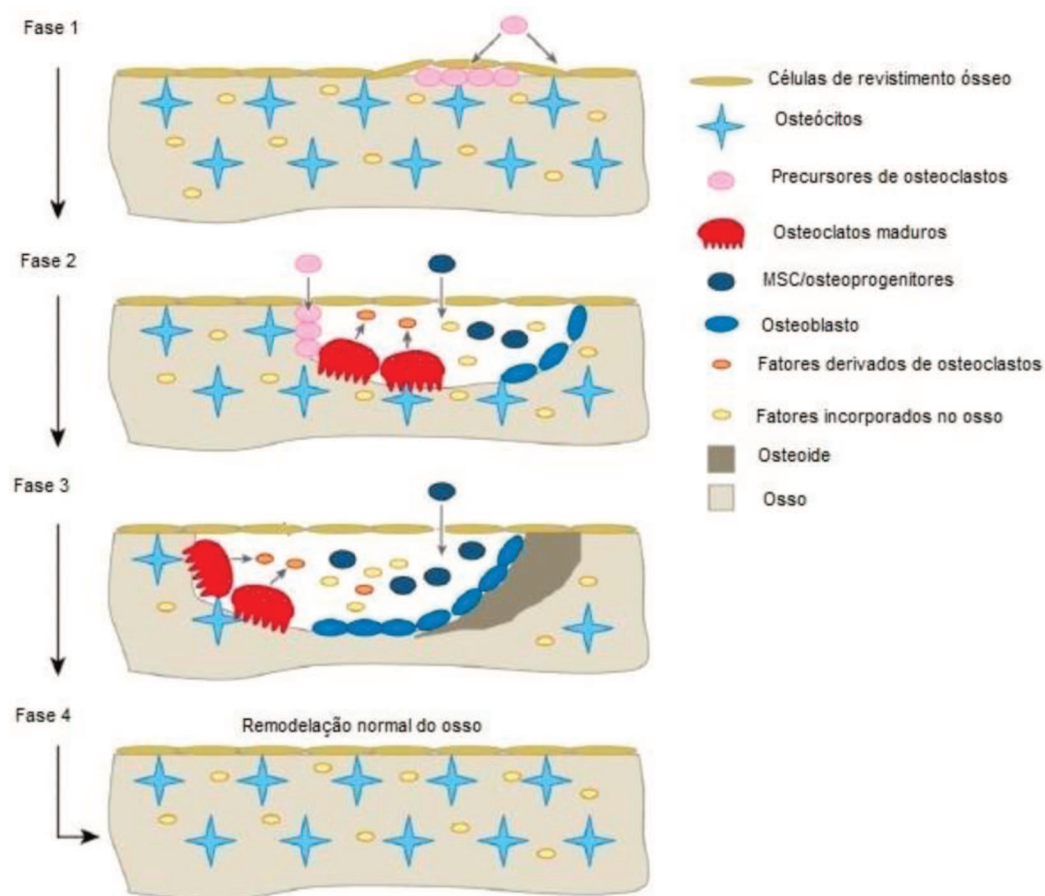


Figura 12 - Quatro fases da remodelação óssea. 1) Início da remodelação; 2) Reabsorção óssea; 3) Formação do novo osso; 4) Fim da remodelação (Feng & McDonald, 2011)

A unidade básica multicelular (BMU) é o local inicial da remodelação óssea, que compreende as células envolvidas no processo (Eriksen, 2010) e o local onde ocorre essa remodelação denomina-se de compartimento de remodelação óssea (BRC) (Feng & McDonald, 2011; Mescher, 2013). No processo de remodelação óssea, os osteócitos são as células que irão detetar alguma deformação no osso, provocadas por forças mecânicas ou alguma microfratura presente no osso antigo, e posteriormente transmitir o sinal para recrutar os precursores dos osteoclastos ao respetivo local. As células precursoras podem ser recrutadas através da medula óssea ou dos capilares, fixando-se à matriz óssea e devido às elevadas concentrações dos fatores M-CSF e RANKL vão diferenciar-se em osteoclastos (Feng & McDonald, 2011).

Na segunda fase da remodelação óssea é iniciado o recrutamento das células estaminais mesenquimais (MSC) e das osteoprogenitoras para o compartimento da remodelação, através da medula óssea ou dos capilares. Estas células diferenciam-se em pré-osteoblastos e depois em osteoblastos, sendo o processo de reabsorção óssea predominante (Feng & McDonald, 2011).

Na terceira fase, os osteoblastos estão funcionais e iniciam a síntese de osteóide, que se deposita no compartimento da remodelação óssea a fim de formar o novo osso, mantendo um equilíbrio entre a quantidade óssea reabsorvida e a formada (Feng & McDonald, 2011).

Na quarta fase, o osteóide vai mineralizar, concluindo-se assim o ciclo da remodelação óssea. Em ossos saudáveis, a quantidade reabsorvida é igual à quantidade formada, não havendo diferenças na massa e na força. Em caso de doenças associadas a este ciclo, em que a remodelação é anormal, há diferenças entre a quantidade reabsorvida e a formada, refletindo-se na massa e na força dos ossos, como o caso da doença osteoporose (D. Burr & Matthew, 2013; Feng & McDonald, 2011; Mescher, 2013).

SISTEMA RANK/RANKL/OPG

O sistema RANK/RANKL/OPG foi identificado no final dos anos de 1990 (W. Liu & Zhang, 2015; Walsh & Choi, 2014) e é constituído por proteínas pertencentes à família dos fatores de necrose tumoral (TNF) (Sigl & Penninger, 2014). Este sistema é muito importante para a homeostase do tecido ósseo, através da regulação dos osteoclastos (Walsh & Choi, 2014). Contudo, este não está presente apenas no tecido ósseo, tendo sido

verificado que estas citocinas também estão presentes noutros tecidos e células, como é o caso das glândulas mamárias, cérebro, nódulos linfáticos (W. Liu & Zhang, 2015) e expressão das células do sistema imunitário (Walsh & Choi, 2014).

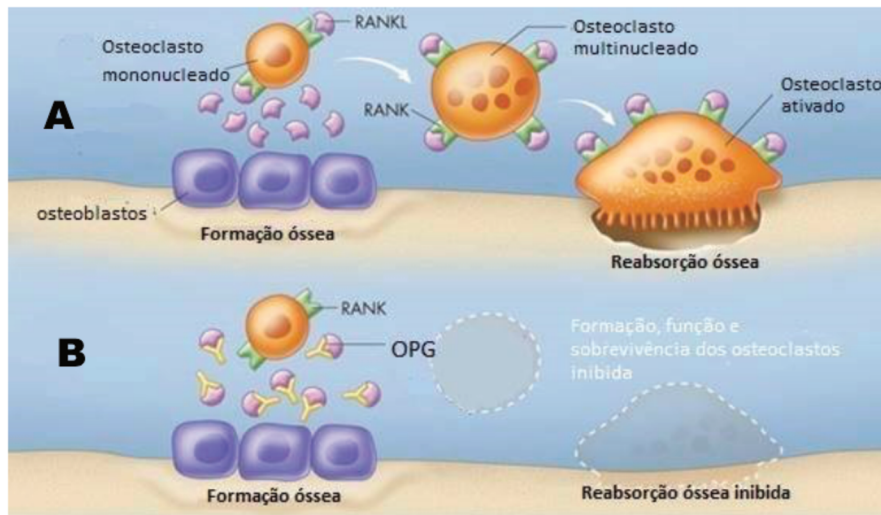


Figura 13 - (A) Interação RANK/RANKL e (B) Interação OPG/RANKL. Adaptado de (Josse, 2009)

Recetor ativador do fator nuclear kappa β (RANK)

O recetor ativador do fator nuclear kappa β (RANK), pertence à superfamília dos recetores para os fatores de necrose tumoral (TNFRSF) (I. Silva & Branco, 2011; Walsh & Choi, 2014). É uma proteína transmembranar tipo I expressa em várias células, nomeadamente pelas células da linhagem dos macrófagos/monócitos (W. Liu & Zhang, 2015), como os precursores dos osteoclastos e osteoclastos maduros, células B e T, células dendríticas, fibroblastos e condrócitos (I. Silva & Branco, 2011). Também pode ser expressa noutros tecidos como músculo esquelético, timo, fígado, cólon, glândulas mamárias, próstata e pâncreas (I. Silva & Branco, 2011). Outros nomes são dados a este recetor, para além de RANK, como recetor de citocinas induzido por ativação do fator de necrose tumoral (TRANCE-R) ou recetor de ativação da diferenciação dos osteoclastos (ODAR) (Walsh & Choi, 2014).

A família destes recetores não têm atividade enzimática intrínseca, sendo necessária a interação de um fator necrose tumoral (Walsh & Choi, 2014), como é o caso do RANKL que é produzido pelos osteoblastos (I. Silva & Branco, 2011), conduzindo à maturação dos osteoclastos funcionais (Hsu et al., 1999; Perry et al., 2015; F. Xu & Teitelbaum, 2013).

Dougal e os seus colaboradores, em 1999, conduziram um ensaio experimental em ratos, cujo gene que codifica para o RANK foi eliminado, levando à deficiência deste recetor. Os ratos foram caracterizados por uma osteopetrose profunda, não havendo diferenciação das células mielóides progenitoras em osteoclastos, resultando numa ausência de reabsorção óssea. Ainda no mesmo ensaio, os ratos com ausência de expressão de RANK, não apresentaram nódulos linfáticos periféricos e as células B apresentavam-se em numero reduzido (Dougall et al., 1999).

Noutro estudo, Li e os seus colaboradores (2000), usaram ratos com deficiência de RANK e observaram, que durante o crescimento endocondral, as placas de crescimento eram mais pequenas e os ratos apresentavam osteopetrose (“osso de pedra”), tendo os autores atribuído estes resultados à ausência de reabsorção óssea em consequência da não diferenciação e maturação dos osteoclastos (Li et al., 2000).

Ambos os estudos vêm apoiar a teoria de que o RANK é expresso em células hematopoiéticas e osteoclastos e, que a ausência de diferenciação osteoclástica nos ratos sem o gene do RANK é um defeito intrínseco nas células de linhagem hematopoiética (Dougall et al., 1999; Li et al., 2000).

Ligando do recetor ativador do fator nuclear kappa β (RANKL)

O ligando do recetor ativador do factor nuclear kappa β (RANKL) pertence à família dos fatores de necrose tumoral (Lacey et al., 1998; W. Liu & Zhang, 2015; Walsh & Choi, 2014; Wong et al., 1997), sendo a sua expressão mediada pelos osteoblastos e células estromais (Nakashima et al., 2000; Walsh & Choi, 2014), podendo ainda ser encontrado nos linfócitos T e nos pulmões (Walsh & Choi, 2014). O RANKL foi descoberto independentemente por quatro grupos de investigadores, razão pela qual pode assumir denominações diferentes (Walsh & Choi, 2014). Em 1997, Wong e seus colaboradores denominaram-no de citocina induzida por ativação relacionada com o fator de necrose tumoral (TRANCE). Em 1998, Lacey et al., deram o nome de ligando da osteoprotegerina (OPGL) e, ainda Yasuda e os seus colaboradores apelidaram o RANKL de fator de diferenciação osteoclástica (Lacey et al., 1998; Wong et al., 1997; Yasuda et al., 1998).

A proteína é muito importante na osteoclastogénese, visto ligar-se aos recetores RANK dos precursores dos osteoclastos e, participar na regularização e diferenciação dos

mesmos em osteoclastos (Walsh & Choi, 2014; F. Xu & Teitelbaum, 2013; Yasuda et al., 1998).

O RANKL existe em duas formas, uma forma solúvel e outra forma membranosa (I. Silva & Branco, 2011; Walsh & Choi, 2014). A forma solúvel tem menor capacidade de regularização dos osteoclastos. Normalmente é expressa na forma de membrana, pelos osteoblastos e células T ativadas, mas devido a clivagem proteolítica, pelas metaloproteinases da matriz (MMP3 e MMP7), esta transforma-se na forma solúvel (I. Silva & Branco, 2011).

Existe um estudo experimental realizado por Kong et al (1999), em que foi deletado o gene que codificava o RANKL em ratos e, deste modo, os seus osteoblastos não expressavam esta proteína. O ensaio demonstrou a importância do RANKL, relativamente à osteoclastogénese, sendo necessário na regularização dos osteoclastos, pela ligação desta ao seu recetor RANK, presente na membrana dos precursores dos osteoclastos. Com esta ausência, os ratos apresentaram osteopetrose, visto que durante a remodelação óssea, não existe a fase da reabsorção (Kong et al., 1999). Este estudo vem ao encontro de outros estudos sobre o RANK, nomeadamente, a investigação feita por Li e os seus colaboradores (2000) e Dougall et al (1999).

Osteoprotegerina (OPG)

A osteoprotegerina (OPG) pertence à superfamília dos fatores de necrose tumoral, tendo sido descoberta e denominada por diferentes investigadores (I. Silva & Branco, 2011; Walsh & Choi, 2014). Tsuda e os seus colaboradores (1997), deram o nome de fator inibidor da osteoclastogénese (OCIF), Kwon e os seus colaboradores (1998), identificaram esta citocina e denominaram de tropina redutase 1 (TR1) e por ultimo, Theodore e seus colaboradores (1998), denominaram de receptor-1 derivado de células dendríticas foliculares (FDCR-1) (Kwon et al., 1998; E. Tsuda et al., 1997; Yun et al., 1998). No entanto, a Osteoprotegerina foi descoberta e denominada primeiramente por Simonet e os seus colaboradores (1997) e Rodan and Martin (1997) (W. Liu & Zhang, 2015).

A Osteoprotegerina tem uma grande afinidade para o RANKL, e, como tal a ligação destes vai impedir a ligação do RANKL aos recetores RANK, presentes na membrana dos precursores dos osteoclastos, afetando a osteoclastogénese e a remodelação (W. Liu & Zhang, 2015; Perry et al., 2015; Walsh & Choi, 2014).

Simonet e seus colaboradores (1997), durante o seu estudo, conseguiram identificar a OPG, através do DNA dos intestinos dos ratos. Detetaram que em ratos transgênicos, cuja expressão de OPG era acima do normal, os ratos apresentavam osteopetrose. Pode-se concluir que a Osteoprotegerina é muito importante na osteoclastogênese, visto que quanto maior o número desta glicoproteína, maior o bloqueio no RANKL, não deixando o RANKL ligar-se ao RANK. Deste modo, não há formação de osteoclastos maduros e funcionais, não havendo reabsorção óssea (W. Liu & Zhang, 2015; Simonet et al., 1997; Walsh & Choi, 2014).

REGENERAÇÃO ÓSSEA

A regeneração óssea é um processo fisiológico complexo, que ocorre naturalmente ao longo da nossa vida, não só ao nível de fraturas causadas por fatores externos, mas também por microfraturas causadas diariamente (Dimitriou, Jones, McGonagle, & Giannoudis, 2011; Oryan, Alidadi, Moshiri, & Maffulli, 2014). Este processo conta com o recrutamento das células envolvidas, expressão génica e síntese de fatores específicos, que irão restaurar a integridade e funcionamento ósseo (Komatsu & Warden, 2010).

A regeneração óssea pode ocorrer de duas maneiras, sendo a regeneração da fratura, onde o próprio osso se regenera a si próprio e, a regeneração guiada, onde é necessário recorrer a meios cirúrgicos com enxertos autólogos, aloenxertos ou xenoenxertos (Campana et al., 2014; Chiarello et al., 2013; Marsell & Einhorn, 2011b; Oryan et al., 2014; Sathyendra & Darowish, 2013).

Fraturas

As fraturas podem ser caracterizadas em microfraturas e macrofraturas. As microfraturas acontecem diariamente, pelo excesso de carga aplicada no osso ou por tumores ósseos que vão enfraquecendo os ossos. As macrofraturas são fraturas de maiores dimensões, que podem ser causadas pelo excesso de microfraturas, ou pelo excesso de carga, que leva à quebra, denominando de “fratura de stress”. Existem ainda fatores patológicos, no caso de doenças ósseas ou subnutrição, que deixam o osso com propriedades mecânicas mais fracas, ficando este mais suscetível a fraturas (Oryan, Monazzah, & Bigham-Sadegh, 2015b).

Regeneração de fraturas

A cicatrização de fraturas ósseas é um processo biológico complexo, que envolve a expressão de moléculas e células capazes de reabsorver o tecido lesado e substituí-lo por novo tecido. Dependendo do tipo de fratura, este pode ser de cicatrização direta ou primária e cicatrização indireta ou secundária. O processo de reparação é muito importante, na medida em que é necessário o osso voltar à sua forma original e com as propriedades mecânicas e biológicas anteriores à fratura (Gibon et al., 2017; Marsell & Einhorn, 2011a; Sathyendra & Darowish, 2013).

Regeneração Indireta

A cicatrização indireta é caracterizado pelos processos de ossificação endocondral e intramembranosa e está compreendido em cinco fases: a fase inflamatória, a fase de formação do calo cartilagem mole, a fase de neovascularização ou angiogénese, a fase de formação do calo ósseo e a remodelação, processo que irá reestabelecer as propriedades ósseas (Gibon et al., 2017; Marsell & Einhorn, 2011a; Sathyendra & Darowish, 2013).

Fase inflamatória

Aquando da fratura, os vasos sanguíneos, o tecido ósseo e o tecido mole à volta são lesionados. Inicialmente, é formado um hematoma devido à formação de um coágulo de fibrina e, este vai ser como um molde do processo de cicatrização, confinando as células e as moléculas, naquele mesmo espaço, ilustrado pela figura 14 (Sathyendra & Darowish, 2013). A fase inflamatória, comum a todos os processos de cicatrização óssea, tem um papel muito importante na cascata de regeneração, sendo responsável pelo recrutamento das células inflamatórias, de células mesenquimais e pela estimulação da angiogénese (Schmidt-Bleek et al., 2012)

A fase inflamatória é acompanhada de duas fases: a fase aguda (proinflamação) e a fase inflamatória. Na fase inflamatória aguda, ocorre no início da fratura, existe produção de citocinas, que medeiam a proliferação celular e a angiogénese. Numa primeira parte, há recrutamento de neutrófilos polimorfonucleares, que são atraídos pelas células mortas e pelos detritos deixados pelo trauma. Os neutrófilos produzem interleucinas 6 (IL-6), com o objetivo de atrair os macrófagos ósseos (*osteomacs*) (Claes et al., 2012). Aqui, as concentrações de interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) e fatores de necrose tumoral alfa (TNF- α) estão muito altas, sendo que a IL-1, produzida pelos macrófagos, vai recrutar as células

mesenquimais, vindas da medula óssea e do periósteo para serem diferenciadas em condrócitos, a fim de se formar o calo de cartilagem (Giannoudis et al., 2015).

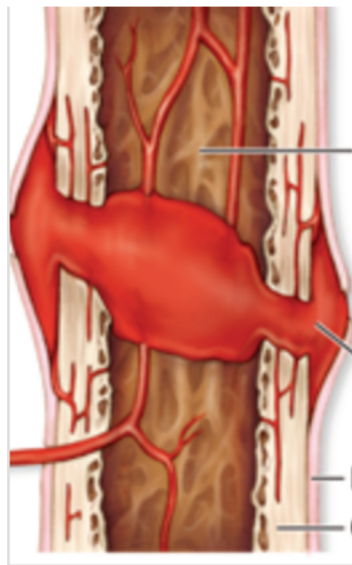


Figura 14 - Fase inflamatória, caracterizada pela presença de hematoma (Mescher, 2013).

I. Fase de formação do calo mole

A formação do calo cartilaginoso é gerada pela hipoxia do local, que origina a diferenciação das células mesenquimais em condrócitos. A produção da cartilagem é importante para dar estabilidade ao osso e às células, de maneira a que seja possível a formação de vasos sanguíneos, visto que a produção de osso precisa de fornecimento de oxigênio (Giannoudis et al., 2015; Sathyendra & Darowish, 2013).

A falta de sangue, vai libertar fatores de crescimento transformantes (TGF- β 2 e TGF- β 3) e ainda fatores de crescimento e diferenciação (GDF-5), promovendo assim a diferenciação das células mesenquimais em condrócitos (Giannoudis et al., 2015). A proliferação dos condrócitos criam um molde (Figura 15), com a secreção de colagénio tipo II (colagénio da cartilagem), sendo a estabilidade mecânica aumentada. Os condrócitos hipertrofiam e há produção de fatores angiogénicos (angiopoetina) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Giannoudis et al., 2015; Marsell & Einhorn, 2011a). Nesta altura, também há a libertação de proteínas morfogénicas ósseas, com a finalidade de recrutar os osteoblastos (Sathyendra & Darowish, 2013).

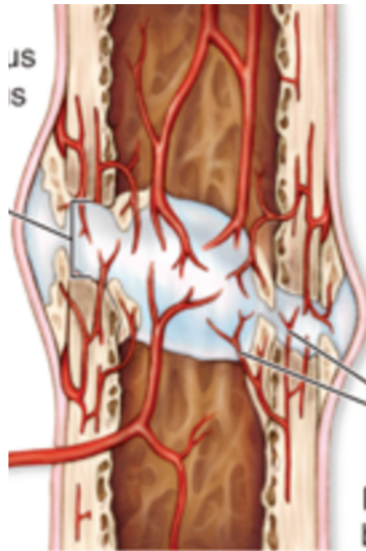


Figura 15 - Fase da formação do calo mole de cartilagem (Mescher, 2013).

II. Fase angiogénese e neovascularização

Uma vez que o calo mole é formado, a estabilidade é aumentada e os condrócitos iniciam o processo de apoptose. Aqui, temos a presença de duas moléculas no processo de vascularização, as proteínas vasculares morfogénicas (angiopoetina-1 e 2) e o VEGF.

A angiopoetina é produzida no início da fratura, a fim de promover o crescimento vascular no periósteo, para se reestabelecer a ligação dos vasos sanguíneos.

Por outro lado, a VEGF é considerada a mais importante na regeneração vascular, sendo expressa pelos condrócitos hipertróficos, com função a agregação e proliferação de células mesenquimais endoteliais para o plexo vascular, já existente (Marsell & Einhorn, 2011a).

III. Fase de formação de calo ósseo rígido

A fase da formação do calo rígido advém da formação do calo mole e é como uma segunda remodelação, substituindo o tecido cartilaginoso por tecido ósseo imaturo “*woven bone*” e, posterior tecido lamelar ósseo (Marsell & Einhorn, 2011a; Sathyendra & Darowish, 2013). O TNF- α presente vai induzir a apoptose dos condrócitos hipertróficos, promovendo o recrutamento de células mesenquimais com potencial osteogénico. A presença de M-CSF, RANKL e OPG vão recrutar e diferenciar células osteoblásticas e osteoclásticas, com a finalidade de formar o tecido ósseo (Marsell & Einhorn, 2011a). A atividade das células osteoclásticas e osteoblásticas não cessam e, os osteoclastos continuam a reabsorver o osso, enquanto os osteoblastos formam novo osso

lamelar, ilustrado pela figura 16 (Marsell & Einhorn, 2011a; Sathyendra & Darowish, 2013).



Figura 16 - Fase de formação do calo ósseo rígido (Mescher, 2013).

IV. Formação do novo osso

A última fase remete para a remodelação óssea, os vasos sanguíneos estão formados e o osso tem uma fonte de oxigênio e nutrientes necessários à sua homeostasia. A atividade osteoclástica e osteoblástica está ativa, com os osteoclastos a reabsorverem o tecido e os osteoblastos a formarem novo tecido ósseo. Algumas citocinas estão reduzidas, no entanto as IL-1, TNF- α e BMP-2 estão aumentadas, devido à atividade dos osteoblastos e osteoclastos (Claes et al., 2012; Marsell & Einhorn, 2011a; Sathyendra & Darowish, 2013).

Por fim, o osso vai ganhando a sua forma original (Figura 17) e, gradualmente, a força e estabilidade mecânica vão aumentando, até uma fase onde o osso já suporta o peso do corpo e está finalmente formado (Marsell & Einhorn, 2011b; Sathyendra & Darowish, 2013).

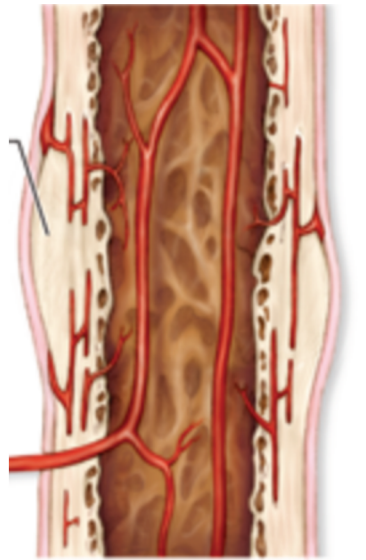


Figura 17 - Remodelação do novo osso, estando finalizada a cicatrização completa da fratura (Mescher, 2013).

Cicatrização directa ou primária

A cicatrização direta ou primária, também nomeada cicatrização óssea dos sistemas Haversianos, ocorre apenas por ossificação intramembranosa com necessidade de recorrer ao campo operatório. O tempo de cicatrização direta, depende de pessoa para pessoa e é um processo lento. No entanto, alguns fatores podem influenciar esse tempo, nomeadamente, fumadores, a idade e doenças crónicas, nomeadamente diabetes e hipertensão arterial (Sathyendra & Darowish, 2013).

Para que ocorra cicatrização direta, tem de haver condições, nomeadamente, estabilidade e imobilização do membro e as faces da fratura têm de estar em contacto, sendo necessário recorrer a meios cirúrgicos com uso de parafusos e placas. A cicatrização primária será menos afetada pela inflamação, tendo um influxo de células muito menores, que poderá durar alguns anos (Claes et al., 2012; Marsell & Einhorn, 2011) e, pode ocorrer de duas formas: cicatrização de contacto ou cicatrização de intervalo.

A cicatrização por contacto, tem como condições, o intervalo entre as faces serem menos de 0.01mm e tensão interfragmentária ser menos de 2%. Inicialmente, os osteoclastos vão reabsorver osso e formar cavidades longitudinais. Simultaneamente os sistemas Haversianos são reestabelecidos e os vasos sanguíneos atravessam aqueles canais, trazendo precursores osteoblástico e agregando novamente o osso (Marsell & Einhorn, 2011).

A cicatrização por intervalo é diferente da anterior, pois a formação dos canais Haversianos e a união do osso não se dá em simultâneo e, o intervalo entre as faces deve estar entre 0.8 mm e 1 mm.

Inicialmente, o local da fratura é preenchido com osso lamelar orientado perpendicularmente ao osso. Os vasos sanguíneos são reestabelecidos e trazem para a zona da fratura, células precursoras dos osteoblastos, sendo que os osteoblastos vão formar osso lamelar na horizontal, com propriedades mecânicas mais fracas (Figura 18B).

Uma segunda etapa da cicatrização por intervalo vai envolver a reabsorção do osso lamelar pelos osteoclastos e a formação de um novo osso pelos osteoblastos, tendo este a orientação normal do restante osso e as propriedades mecânicas regulares (Marsell & Einhorn, 2011).

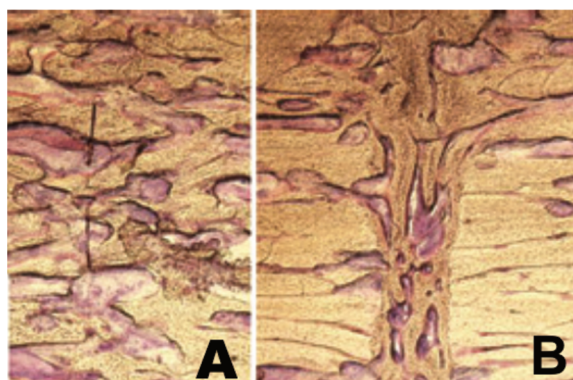


Figura 18 - Cicatrização direta. (A) Cicatrização por contacto e (B) Cicatrização por intervalo. Adaptado de (Claes et al., 2012)

Fatores que influenciam o tempo de cicatrização

O tempo da cicatrização direta depende de pessoa para pessoa e, é um processo lento. No entanto, alguns fatores podem influenciar esse tempo, nomeadamente, os fumadores, a idade e as doenças crónicas, como é o caso da diabetes mellitus e da hipertensão arterial (Sathyendra & Darowish, 2013).

Os fumadores são um grupo de risco para o atraso da cicatrização da fratura, apesar do mecanismo ainda não estar bem definido, estudos evidenciam esse atraso na cicatrização (Donigan, Fredericks, Nepola, & Smucker, 2012).

Castillo e os seus colaboradores, realizaram um estudo comparativo em doentes com fratura na tibia, dividindo-os em três grupos: pacientes não fumadores, ex-fumadores e fumadores correntes. Concluíram que os ex-fumadores demoram mais tempo a cicatrizar a fratura do que os fumadores e os não fumadores.

Rothem e os seus colaboradores, acreditam que o uso de nicotina influencia os genes que expressam os osteoblastos, podendo estes induzir a proliferação celular. Por outro lado, os autores afirmam serem precisos mais estudos, de maneira a compreender melhor a relação da nicotina e do metabolismo ósseo (Rothem, Rothem, Dahan, Eliakim, & Soudry, 2011). Todavia, esta relação pode ser dose-dependente e, ainda o fato dos cigarros não conterem só nicotina, pode haver alguma relação com outro constituinte destes (Castillo, Bosse, MacKenzie, & Patterson, 2005; Rothem et al., 2011; Scolaro et al., 2014).

A idade também é um fator muito importante com influência na regeneração de fraturas ósseas. Pacientes no período da menopausa e outros pacientes com idade avançada têm mudanças ao nível da composição óssea, fatores crescimento e citoquinas, influenciando o metabolismo do osso (Sathyendra & Darowish, 2013; Tarantino et al., 2013).

Stoltzing e os seus colaboradores, em 2008, observaram uma diminuição do número e da capacidade proliferativa das células mesenquimais em humanos com idade avançada (Stolzing, Jones, McGonagle, & Scutt, 2008). Zhou et al., (2008), também notaram que a população de células mesenquimais estava diminuída, afetando a sua proliferação.

Beil e os seus colaboradores, em 2010, realizaram um estudo em ratos com menopausa e viram que estes apresentavam baixa mineralização e remodelação, baixa diferenciação celular, diminuição das respostas osteoblásticas e dificuldade na vascularização (Beil et al., 2010), evidenciando que a idade é um fator que pode perturbar a cicatrização de fraturas ósseas (Beil et al., 2010; Sathyendra & Darowish, 2013; Stolzing et al., 2008; S. Zhou et al., 2008).

Outros fatores que podem influenciar a regeneração de fraturas são algumas comorbidades, como as doenças crônicas, que afetam tanto jovens como idosos, nomeadamente a diabetes mellitus e a hipertensão arterial (Sathyendra & Darowish, 2013; Tarantino et al., 2013).

A diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica que aumenta o risco de fratura, que interfere com a formação do osso e, ainda perturba a reparação deste (Jiao, Xiao, & Graves, 2015). A doença aumenta o número e a atividade dos osteoclastos e baixa os osteoblastos, levando a um aumento de reabsorção óssea e uma diminuição de formação do osso. Na DM, existem os produtos finais da glicação avançada (AGE), que são gerados por reações enzimáticas entre os aldeídos formados na redução dos açúcares e dos aminoácidos vindos das proteínas, lípidos e ácidos nucleicos. Os AGE, vão acumular-se

e, estudos indicam que estes produtos podem ativar os osteoclastos ou alterar o osso para um ambiente favorável à reabsorção (X. N. Dong, Qin, Xu, & Wang, 2011; X. Yang et al., 2015).

Por outro lado, Yang e os seus colaboradores, em 2015, inquiriram se a reabsorção osteoclástica não esta relacionada com o aumento dos AGE, em idosos, mas sim no fato de os osteoclastos não reabsorverem o tecido ósseo antigo e danificado, levando à fragilidade do osso. Contudo, em pacientes mais novos, há um aumento da atividade osteoclástica e consequentemente uma reabsorção óssea mais marcada (X. Yang et al., 2015). A baixa formação óssea deve-se ao fato dos AGEs modificarem o colagénio, comprometendo a integrina que medeia a ligação dos osteoblastos à matriz (McCarthy, Uemura, Etcheverry, & Cortizo, 2004). Ainda em pacientes com DM não tratada, os osteoblastos sofrem apoptose, devido ao aumento de inflamação, que por conseguinte aumenta a expressão de citocinas inflamatórias (Coe, Irwin, Lippner, & McCabe, 2011).

A hipertensão é uma doença crónica vascular, que está ligada ao aumento da perda da densidade óssea mineral, influenciando negativamente a reparação de fraturas (Bastos et al., 2013; K. Tsuda et al., 2001; S. Yang et al., 2014). A doença está relacionada com o metabolismo do cálcio no osso, não deixando que este se deposite na matriz e seja excretado, enfraquecendo a densidade mineral, tornando assim os ossos mais fracos.

O estudo efetuado por Bastos e os seus colaboradores, em 2013, evidenciaram que ratos hipertensivos tinham uma densidade óssea e uma reparação inferior aos ratos normotensivos. Os autores sugerem que o fenómeno é causado pela angiotensina II, sugerindo que esta vai afetar a diferenciação dos osteoblastos e assim perturbar a normal reparação óssea (Bastos et al., 2013).

Ainda, estudo efetuado por Tsuda e os seus colaboradores, em 2001, observam em mulheres hipertensivas uma menor densidade mineral óssea, comparativamente às mulheres normotensivas. Sugerem ainda, que a diminuição da densidade deve-se à taxa de excreção do cálcio pela urina (K. Tsuda, Nishio, & Masuyama, 2001).

Regeneração guiada

O processo da regeneração óssea guiada é um método que vem ajudar a reparar defeitos ósseos, seja em caso de maiores fraturas ou patologias. A regeneração guiada conta com a aplicação de enxertos ósseos e/ou o uso de enxertos biomiméticos do osso humano, a fim de se formar osso saudável com características de suporte e proteção (Lee & Kim, 2014).

Os enxertos ósseos são definidos como um material implantado que promove a regeneração do osso, sozinho ou combinado com outros materiais que podem ajudar a aumentar a osteogênese, a osteocondutibilidade e a osteoindução (Oryan et al., 2014). Estes, podem ser de dois tipos diferentes, os enxertos autólogos e aloenxertos ou xenoenxertos (Campana et al., 2014; Chiarello et al., 2013; Gusić et al., 2014; Oryan et al., 2014).

A regeneração óssea guiada vai depender das propriedades dos enxertos, como: (Egol et al., 2015; Jakoi, Iorio, & Cahill, 2015)

- I. Osteocondução: propriedade da substancia/material que vai servir de esqueleto para o crescimento do novo osso;
- II. Osteogênese: constitui as células que estão presentes na substancia/material que irão contribuir para a formação do novo osso;
- III. Osteoindução: este refere os fatores de crescimento e citocinas presentes no enxerto que estimulam a diferenciação das células osteoprogenitoras em osteoblastos;

Estas características são muito importantes, de maneira a haver uma boa reparação óssea, com o uso de enxertos. Os enxertos apresentam características diferentes, no entanto, algumas características poderão ser aumentadas (Egol et al., 2015).

Enxerto Autólogo

O enxerto autólogo da crista ilíaca é o método mais usado e tem propriedades osteocondutivas, osteoindutivas e osteogênicas (Chiarello et al., 2013; Egol et al., 2015), conferindo estabilidade mecânica e induzindo a formação do novo osso (Dumic-cule, Pecina, & Jelic, 2015). No entanto existem desvantagens, como a morbidade no sítio dador (Arner & Santrock, 2014; J. B. Chang & Lee, 2016; Egol et al., 2015; Jakoi et al., 2015), a quantidade limitada de osso que temos no nosso corpo, os longos tempos de

operação, as possíveis novas operações (Chiarello et al., 2013), o aumento da perda de sangue e longos internamentos hospitalares (J. J. Park, Hershman, & Kim, 2013), sendo a maior complicação é a dor crônica no sítio dador (Chiarello et al., 2013).

Apesar de esta abordagem ser “*gold standard*”, as limitações levaram a que vários investigadores recorressem a estratégias de engenharia do tecido ósseo, como alternativa a este método (J. B. Chang & Lee, 2016).

Aloenxertos

Os enxertos alogénicos vêm de um dador que não a própria pessoa, podendo vir tanto de um dador vivo, como de um dador morto (Chiarello et al., 2013; Shibuya & Jupiter, 2015). Os aloenxertos têm certas propriedades como a osteocondução (Ehrler & Vaccaro, 2000) e alguns fatores de crescimento osteoindutivos, apresentando uma velocidade de regeneração mais baixa (Arner & Santrock, 2014).

Os enxertos antes de serem usados são submetidos a vários processos de esterilização, de maneira a reduzir a transmissão de doenças (Arner & Santrock, 2014; Shibuya & Jupiter, 2015), passando por radiação de raios gama e esterilização por óxido de etileno (Arner & Santrock, 2014). Os processos de esterilização por radiação dos raios gama são custo-efetivo e embora consigam eliminar alguns vírus patogénicos no tecido do osso, o próprio perde propriedades importante como a osteoindução e a força (Moskala, 2003).

As vantagens existentes são o fato de não haver qualquer tipo de problemas para o sítio dador, tempo de cirurgia menor visto que o osso dador não é retirado da própria pessoa, número ilimitado de ossos para transplante e o facto de haver vários tamanhos e formas (Ehrler & Vaccaro, 2000).

Por outro lado, as desvantagens são a possível transmissão de doenças, não possuir propriedades de osteogénese e ainda os problemas relacionados com a imunocompatibilidade (Arner & Santrock, 2014), podendo este ser mesmo rejeitado pelo corpo e o transplante falhar (Gusić et al., 2014).

Existem três tipos de enxertos alogénicos: os frescos, os frescos congelados e ainda os liofilizados, cada um com características diferentes, esquematizadas na tabela 1 (Shibuya & Jupiter, 2015).

Tabela 1 – Características dos enxertos, adaptado de (Shibuya & Jupiter, 2015).

Excertos Frescos	Excertos frescos congelados	Excertos liofilizados
Mais caros	Caraterísticas intermédias	Menos caros
Mais imunocompatíveis		Mais imunocompatíveis
Tempo de vida menor		Tempo de vida maior
Mais rígidos		Mais disponíveis
Caraterísticas osteogénicas e osteocondutivas maiores		Caraterísticas osteocondutivas e osteoindutivas menores
		Utilizados em locais bem vascularizados, onde existem factores indutíveis nativos

Engenharia de tecidos

O uso de enxerto, como já dito anteriormente, apresenta algumas desvantagens ao nível das suas propriedades físicas e químicas, como para o próprio doente. Foi necessário desenvolver novas estratégias através da engenharia de tecidos ósseos (Szpalski et al., 2011), de modo a conseguir integrar todas as características necessárias a uma boa regeneração óssea e, melhorar a qualidade de vida do doente.

Esta área resulta em moldes com características onsteocondutivas, fatores de crescimento osteoindutivos e células percursores osteogénicas (Nayak, Roth, & McGavern, 2014), tentando ainda promover a vascularização, conferindo uma eficiente osteointegração e restauração mais acelerada (Nayak et al., 2014).

Como tal, a engenharia de tecidos compreende três campos, nomeadamente, os moldes ou matriz extracelular, as células presentes nessa matriz e o ambiente à volta dessas (Szpalski et al., 2011).

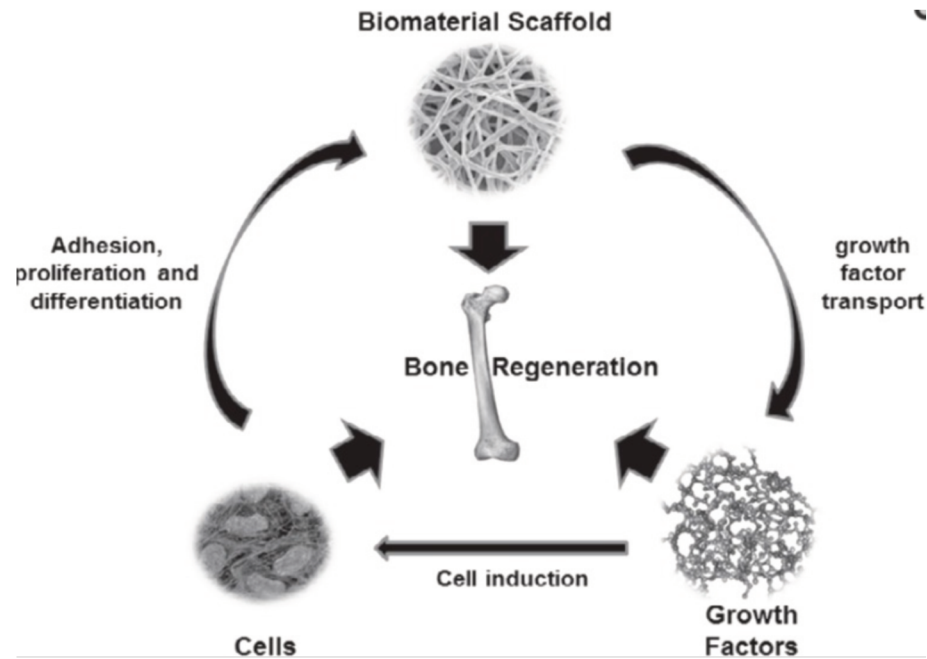


Figura 19 - Componentes da regeneração óssea guiada (Bhattacharya, Ghayor, & Weber, 2016)

Componente celular

A área da engenharia de tecido ósseo é uma área cujo objetivo é o desenvolvimento de substitutos biológicos, de maneira a restaurar, preservar e aprimorar o funcionamento do próprio tecido (Seong et al., 2010).

Um dos campos muito importantes desta área são as células a serem usadas no desenvolvimento deste tecido ósseo. As células de eleição são as células estaminais, sendo que dentro destas temos (Szpalski, Barbaro, Sagebin, & Warren, 2012; P. Wang et al., 2015):

- I. Células estaminais embrionárias;
- II. Células estaminais derivadas da medula óssea;
- III. Células estaminais mesenquimais derivadas do sangue do cordão umbilical;
- IV. Células estaminais derivadas do tecido adiposo;
- V. Células estaminais derivadas do periósteo;
- VI. Células estaminais pluripotentes induzidas.

Estas células tem sido bastante investigadas e usadas para produzir modelos de osso biológico em 3 Dimensões (Ping Wang, Xian Liu, Liang Zhao, Michael D. Weir, Jirun Sun, Wenchuan Chen, 2015).

I. Células estaminais embrionárias

As células estaminais embrionárias possuem características que fazem delas uma das melhores células para a engenharia de tecido (Ping Wang, Xian Liu, Liang Zhao, Michael D. Weir, Jirun Sun, Wenchuan Chen, 2015; Seong et al., 2010), quando combinados com esqueletos poliméricos tridimensionais e meios de cultura apropriados (Seong et al., 2010). No entanto, tem de haver a interrupção de um período gestacional, levantando questões éticas (Ohnishi et al., 2012).

As células estaminais derivam das células interiores do blastocisto, com 5-6 dias e possuem atividade de regeneração ilimitada (Kasner, Hunter, Ph, Kariko, & Ph, 2013), tendo capacidade para se diferenciarem nas três camadas germinativas (Desai, Rambhia, & Gishto, 2015), nomeadamente: a ectoderme, que compõe o epitélio neural, gânglios embrionários e epitélio escamativo; a mesoderme, de onde fazem parte a cartilagem, osso, músculo liso e o músculo estriado e, a endoderme, que faz parte o epitélio intestinal (Thomson et al., 2012).

Como tal, as células do tecido ósseo vão diferenciar-se a partir das células da mesoderme do blastocisto (Seong et al., 2010). Para se dar esta diferenciação, é necessário haver manipulação do meio de cultura, sendo este composto por meio de cultura médio, com fosfato beta-glicerol, dexametasona e ácido ascórbico (Barberi, Willis, Socci, & Studer, 2005; Seong et al., 2010).

Marolt et al. (2012), conseguiram produzir tecido ósseo com células embrionárias, postas numa matriz 3D osteocondutiva num bioreactor com perfusão média. Este tecido ósseo foi implantado em ratos imunodeficientes, o que resultou na produção de matriz óssea e na sua manutenção, sem a formação de teratomas, que seriam normalmente vistos quando estes tipos de células são implantados sem haver diferenciação, sozinhas ou em alguma matriz (Marolt et al., 2012).

Kuznetsov, et al (2011), também demonstraram o mesmo que os autores anteriores. É possível produzir tecido ósseo a partir das células estaminais embrionárias, postas em meio de cultura médio e transferidas, posteriormente, para uma matriz osteocondutiva. Também demonstraram a diferença entre fazer o transplante com células diferenciadas e não diferenciadas. O transplante com células diferenciadas promove a produção de matriz óssea, enquanto que o transplante de células não diferenciadas vai promover a formação de teratomas (Kuznetsov, Cherman, & Robey, 2011).

Pelo testemunho de ambos os autores, podemos perceber que a produção de novos tecidos ósseos não envolve só uma área, sendo preciso um meio e uma matriz, onde serão implantadas as células, para que estas possam diferenciar-se e depois serem transplantadas (Kuznetsov et al., 2011; Marolt et al., 2012).

II. Células estaminais derivadas da medula ossea

As células derivadas da medula óssea são uma fonte de aplicação para a regeneração do tecido ósseo, muito usada (Kern et al., 2006; Wang et al., 2015). No entanto, esta tem desvantagens como é o caso da colheita ser feita através de uma aspiração, como é o caso da crista ilíaca e dos canais medulares de ossos longos (Gamie et al., 2014), sendo este um procedimento muito invasivo para o dador (Kern et al., 2006). Ainda, o fator idade é uma desvantagem, sendo que o número e o potencial de diferenciação diminuem com o avanço da idade (Kern et al., 2006; P. Wang et al., 2015) e a quantidade limitada, estando disponível apenas em concentrações de 0.01-0.001% (Gamie et al., 2014).

Depois de feita a colheita, estas serão introduzidos num meio de Ficoll (Kern et al., 2006) ou Percoll (G. Liu et al., 2008) e, através da centrifugação do gradiente de densidade, consegue-se isolar a fração das células mononucleares (Kern et al., 2006), passando estas depois para um meio de cultura osteogénico, sendo este composto por soro de bovino fetal, dexametasona, beta-fosfoglicerol e ácido ascórbico (G. Liu et al., 2008).

Liu, et al (2008), demonstraram ser possível com células estaminais da medula óssea e através de uma matriz osteocondutiva, a produção de tecido ósseo na tíbia de uma cabra (G. Liu et al., 2008).

Shang et al., (2001), também conseguiram demonstrar que é possível formar novo osso a partir deste tipo de células. Os investigadores utilizaram um meio de água modificado, que contém soro bovino fetal, L-glutamina, dexametasona, fosfato de beta glicerol, ácido ascórbico e penicilina e uma matriz de alginato, onde incorporaram as células diferenciadas e, colocaram o implante na parte onde o crânio tinha o defeito ósseo, havendo regeneração e reparação dessa falha (Shang et al., 2001).

Zhu e os seus colaboradores, em 2006, realizaram um estudo em cabras, em que usaram as mesmas células osteoinduzidas numa matriz de coral, para reparar defeitos no fémur destes animais. Estes investigadores utilizaram dois grupos, sendo o grupo de estudo constituído por 10 cabras, onde foram implantadas matrizes com as células e, o grupo de controlo, que apresentava o mesmo número de cabras, diferindo no implante da

matriz, que não apresentava células. A colheita foi feita também por aspiração da medula no íliaco e, o grupo de controlo não teve qualquer tipo de crescimento de tecido ósseo, enquanto que o grupo experimental obteve produção de tecido ósseo (Zhu, Liu, Cui, & Cao, 2006).

III. Células estaminais derivadas do tecido adiposo

As células derivadas do tecido adiposo tem propriedades de autorregeneração e diferenciação celular (Dai et al., 2016). Comparativamente a outras células estaminais, as células do tecido adiposo estão presentes em enorme quantidade, devido à possível lipossucção subcutânea (Dai et al., 2016). Existem três métodos com a finalidade de retirar tecido adiposo, para posterior isolamento das células: o método de excisão direta, lipossucção e a técnica de Coleman (Dai et al., 2016; Iyyanki et al., 2015), sendo que a mais eficaz é a técnica de Coleman (Iyyanki et al., 2015).

No corpo humano existe dois tipos de tecido adiposo: o tecido adiposo branco e tecido adiposo castanho. O que existe em maior quantidade é o tecido adiposo branco, sendo este o mais utilizado para posterior isolamento e, onde se consegue isolar uma maior quantidade de células estaminais mesenquimais (Bhattacharya et al., 2016).

Um dos fatores que podem desencadear uma menor atividade proliferativa é a idade, sendo que as células da população mais nova têm maiores capacidades osteogénicas e angiogénicas do que as da população mais velha (Wu et al., 2013).

Andor e os seus colaboradores, em 2014, fizeram uma investigação em treze pessoas com defeitos crânio-maxilofaciais, três casos no sinus frontal, cinco casos no osso craniano, três casos na mandíbula e dois casos no septo nasal. Usaram estas células, inicialmente colhidas do tecido adiposo da parede abdominal dos próprios doentes, tendo sido isoladas e cultivadas num meio próprio para haver diferenciação e, serem transferidas para uma matriz, para posteriormente serem implantadas na zona dos defeitos. Os autores indicam que houve crescimento ósseo em todos os defeitos, no entanto houve 3 casos, no grupo do osso craniano que tiveram complicações, sendo que os restantes 10 casos foram tratados com sucesso, apesar de ainda serem precisos mais estudos neste campo (Andor et al., 2014).

Thesleff e os seus colaboradores, em 2011, realizaram um estudo onde verificaram ser possível regenerar osso do crânio com o uso de células estaminais adiposas, conjugados com uma matriz de fosfato beta-tricálcico. A amostra foi constituída por 4

pacientes, tendo os resultados, permitido aos autores afirmarem que esta combinação é um modelo promissor na reparação óssea do crânio (Thesleff et al., 2011).

IV. Células estaminais derivadas do cordão umbilical

As células derivadas do cordão umbilical são uma possível fonte de células estaminais, na área da engenharia de tecidos. Ao contrário de outras células, o processo de recolha não tem qualquer tipo de dor e tem boas propriedades de autorregeneração. Dependendo dos autores e dos protocolos, estas células podem ser colhidos do revestimento do cordão, do tecido perivascular e da substância que cobre a veia e as duas artérias umbilicais, chamado de gelatina de *Wharton* (Ding, Chang, Shyu, & Lin, 2015).

Os cordões umbilicais são retirados do recém-nascido e podem ter uso autólogo ou heterólogo. Tem como vantagens o fato de poder ser um procedimento pouco invasivo e com baixo custo (H. H. K. Xu, 2010), sendo este considerado um resíduo médico (Mennan et al., 2013).

Num estudo realizado por Mennan e colegas (2013), foram utilizadas as três partes do cordão umbilical, para comparar qual destes seria uma melhor fonte para a condrogénese, adipogénese e a osteogénese. Os autores concluíram que estes variam consoante os pacientes e também com a própria região do cordão. A porção da gelatina de *Wharton* e da artéria foram as mais consistentes, enquanto que a células extraídas da veia umbilical e do revestimento do cordão, mostraram ser muito pouco eficazes na osteogénese (Mennan et al., 2013).

Contudo, existem estudos que demonstram a produção de tecido ósseo a partir deste tipo de células. É o caso Wang et al., (2015), que compararam a regeneração óssea de três tipos de fontes celulares, nomeadamente, de células pluripotentes induzidas, células do cordão umbilical e células da medula óssea. Como fonte das células umbilicais usaram a gelatina de *Wharton* do cordão umbilical de bebés saudáveis, cultivaram em meio de cultura DMEM com soro bovino fetal e penicilina/Estreptomicina, e depois procederam à passagem para meio osteogénico com dexametasona, beta-fosfato glicerol, ácido ascórbico e calcitriol e, por fim, implantaram as células numa matriz de cimento de fosfato de cálcio macroporoso (Ping Wang, Xian Liu, Liang Zhao, Michael D. Weir, Jirun Sun, Wenchuan Chen, 2015).

Outro estudo realizado por Zhao et al., (2010), *in vitro*, também realizado com este tipo de células, os mesmos meios de cultura e osteogénicos, alterando apenas a matriz,

sendo esta composta por cápsulas de cimento de fosfato de cálcio com quitosano. Os investigadores encapsularam as células nesta matriz e estudaram a formação de tecido ósseo, tendo sido confirmada a diferenciação óssea e a síntese mineral. Acrescentam ainda, que este tipo celular pode ser uma boa alternativa ao uso de células estaminais da medula óssea, contudo são precisos mais testes, principalmente *in vivo* (H. H. K. Xu et al., 2010).

V. Células estaminais pluripotentes induzidas

Todas as células do nosso organismo, sejam somáticas ou germinativas são provenientes do embrião, sendo células pluripotentes. Células estaminais pluripotentes induzidas são um tipo celular inovador, sendo consideradas uma fonte celular promissora na regeneração de tecidos e, ainda bastantes similares às células embrionárias (Takahashi & Yamanaka, 2013).

As grandes vantagens das células pluripotentes induzidas são o fato de não haver problemas éticos, como o que acontece com as células embrionárias e também a questão imunológica, visto serem do próprio dador (Lou, 2015; Teng, Liu, Krettek, & Jagodzinski, 2014). As células são provenientes dos fibroblastos adultos de células embrionárias (Lou, 2015) e também de células estaminais (Szpalski et al., 2012). No entanto, estas são reprogramadas com fatores de transcrição para darem origem a um estado celular de pluripotência, onde poderão dar origem a qualquer célula (Lou, 2015).

As células pluripotentes induzidas começaram por ser descobertas por Yamanaka e Takahashi, em 2006, que notaram que um conjunto de quatro fatores (Oct4, Sox, Klf4 e cMyc), quando introduzidos nos fibroblastos dos ratos, por adenovírus, induzem a reprogramação genética das células para um estado de pluripotência, num meio com condições favoráveis para o desenvolvimento de células estaminais embrionárias.

Um estudo realizado por Hayashi e colegas, (2012), mostrou ser possível a produção de tecido ósseo com o uso de células estaminais pluripotentes induzidas, em murganhos. Foram colocadas as células em meio cultura DMEM, contendo soro de bovino, dexametasona, beta glicerol fosfato e ácido ascórbico. Num grupo celular usaram radiação e no outro não, mostrando diferenças quanto à formação de teratomas, sendo que o grupo que foi submetido a radiação não originou teratomas (Hayashi et al., 2012).

Já, Jin e colegas (2012), demonstraram ser possível a produção de osso. Os investigadores usaram fibroblastos da pele e, através da introdução dos quatro fatores de

transcrição (Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc), conseguiram produzir células pluripotentes induzidas e, posteriormente, induziram a diferenciação osteoblástica, através de substâncias osteogênicas, nomeadamente, a dexametasona, ácido ascórbico e beta glicerolfosfato (Jin et al., 2013).

VI. Células estaminais derivadas do Perióstio

Apesar de pouco usado, as células derivadas do perióstio podem ser usadas para regenerar tecido ósseo (De Bari et al., 2006; Rosales-Rocabado et al., 2014), sendo removidas do perióstio cirurgicamente. O perióstio é um tecido conjuntivo especializado, presente na superfície do osso, que pode ser dividido em duas camadas, sendo a mais externa, uma camada fibrosa que contém os fibroblastos e fibras de Sahrpey e, uma camada mais interior, camada celular que contém um grande número de células precursoras osteogênicas (Rosales-Rocabado et al., 2014).

Vários estudos indicam que a grande vantagem destas células é a sua capacidade de proliferação, sendo maior que a dos seus comparativos (Agata et al., 2007; Rosales-Rocabado et al., 2014)

Na investigação de Rosales-Rocabado e colegas (2014), foi realizado um estudo comparativo entre as células do perióstio, da medula e os próprios osteoblastos. Os investigadores colheram as células de murganhos e, no caso das células do perióstio, isolaram células dos ossos da cabeça, que foram submetidas a um tratamento enzimático para separarem as células do restante, após centrifugação. Após esta separação, as células foram colocadas em meio com temperatura e atmosfera controlados e, posteriormente, colocadas em meio osteogénico constituído por ácido ascórbico, dexametasona e beta-glicerofosfato. As células do perióstio demonstraram grande proliferação, no entanto houve baixa mineralização, havendo formação de muito pouco osso *in vivo*, concluindo que esta fonte celular não tem um bom potencial osteogénico (Rosales-Rocabado et al., 2014).

Outra investigação realizada por Agata e colegas (2007), mostraram a diferença da osteogenicidade entre as células do perióstio em condições normais e depois do tratamento com fator básico de crescimento dos fibroblastos (bFGF) e com proteína morfogénica óssea 2 (BMP-2) e, as células da medula óssea submetido às mesmas condições. O bFGF vai tornar as células mais predispostas ao BMP-2, aumentando a osteogenicidade de ambas as células. O estudo demonstrou que em condições normais,

as células da medula são melhores, no entanto, se as células do periósteo forem submetidas ao pré-tratamento com bFGF e depois ao tratamento com BMP-2, estas terão melhor osteogenidade que as células da medula óssea. Ambas as células foram transplantadas para uma matriz β -TCP, havendo uma maior formação de tecido ósseo por parte das células do periósteo pré-tratadas (Agata et al., 2007).

VII. Células progenitoras derivadas da trabécula óssea

A trabécula óssea, ao contrario do periósteo, é a parte interna do osso, constituída por uma estrutura esponjosa (Szpalski et al., 2012; Yoshii et al., 2010).

As células da trabécula óssea possuem duas vantagens, nomeadamente um grande potencial osteogénico e o fato de conseguirem gerar células osteoprogenitoras de forma mais consistente e efetiva. No entanto, a sua grande desvantagem é o fato de serem extraídas com o mesmo grau de invasão que as células da medula, através de uma agulha de biópsia, apresentando a mesma morbilidade para o dador que a colheita da medula óssea (Szpalski et al., 2012).

Num estudo efetuado, por Yoshii e os seus colaboradores, em 2010, é feita a comparação entre as propriedades osteogénicas das células progenitoras derivadas da trabécula óssea e as células estaminais da medula óssea. Nesta investigação, os fragmentos da trabécula, foram submetidos à digestão pela tripsina com EDTA, e depois postas em cultura de monocamada e, por fim, foi feita a colheita das células. As células obtidas foram colocadas em meio osteogénico composto por dexametasona, betaglicerofosfato e ácido ascórbico e, posteriormente, empregues numa matriz beta-TCP. Segundo o mesmo protocolo, em comparação com as células da medula, estas células conseguiram formar mais tecido ósseo. Existe uma maior mineralização e maior potencial osteogénico, pelas células da trabécula, tanto *in vitro*, como *in vivo*. Os autores concluem que esta fonte celular pode ser considerada uma alternativa às células da medula, na área da engenharia de tecido ósseo (Yoshii et al., 2010).

Matrizes

Um outro campo de grande relevância na engenharia de tecidos ósseo é a área das matrizes ou esqueletos. Ao longo do tempo, vários investigadores tentaram criar biomateriais que consigam ter as características perfeitas para uma excelente regeneração óssea (Hosseinpour et al., 2017; Susmita Bose, Mangal Roy, 2012; Szpalski et al., 2011). No entanto, ainda não foi possível fazer uma matriz que contenha todas as características necessárias. As características compreendem (Hosseinpour et al., 2017; Susmita Bose, Mangal Roy, 2012):

- I. Biocompatibilidade: com atividade celular normal, incluindo sistemas de sinalização sem ser tóxico para o hospedeiro, ou que as defesas deste, ataquem o implante;
- II. Osteocondutivo: que permita as células aderirem, proliferarem e formar uma nova matriz extracelular, na sua superfície;
- III. Osteoindutivo: através da sinalização e recrutamento de células osteoprogenitoras, que induza a formação do novo osso;
- IV. Vasculogénico: necessária formação de vasos sanguíneos, para haver um bom aporte de nutrientes e oxigénio às células;
- V. Propriedades mecânicas: uma propriedade bastante difícil, visto que tem de alienar à geometria da matriz, sendo que estas devem ser o mais similar possível ao osso hospedeiro;
- VI. Porosidade: o tamanho do poro é muito importante, para haver a difusão de nutrientes e oxigénio, no entanto, esta característica vai reduzir as propriedades mecânicas da matriz;
- VII. Biodegradável: um fator muito importante, pois a matriz deve ser absorvida a um passo controlado *in vivo*, e nos espaços absorvidos criar o novo osso.

Como tal, a busca pelas melhores matrizes levou ao desenvolvimento de diferentes biomateriais, sendo os mais usados (Susmita Bose, Mangal Roy, 2012; Szpalski et al., 2011):

- I. Fofatos de cálcio
- II. Hidroxiapatite
- III. Fosfato octacálcio
- IV. Sulfato de cálcio
- V. Biovidro

- VI. Polímeros sintéticos
- VII. Polímeros Naturais
- VIII. Metais
- IX. Dentina

I. Fosfato de cálcio(CaP)

O biomaterial de Fosfato de cálcio é usado há muitos anos, como um potencial substituto ósseo, devido a sua aparência química (Thrivikraman et al., 2017) e, como tal, apresentam características, que fazem deste um bom biomaterial para o desenvolvimento de matrizes ósseas (Ambard & Mueninghoff, 2006; H.-L. Yang & Sun, 2015).

Os biomateriais de CaP, não sendo perfeitos têm as suas vantagens, nomeadamente, a biocompatibilidade, reabsorção e osteocondutividade, dependendo do tipo que é usado. E as suas desvantagens são, a porosidade, as propriedades mecânicas e a falta de osteoindutividade (Ambard & Mueninghoff, 2006; H.-L. Yang & Sun, 2015).

Ao longo do tempo foram sintetizados algumas matrizes de fosfato cálcio, existindo uma panóplia de biomateriais com esta molécula, tendo todos estas características diferentes (Larsson, 2010), sendo o mais frequentemente usados, as matrizes de (Susmita Bose, Mangal Roy, 2012):

- Cimento de fosfato de cálcio (CPC);
- Fosfato β -tricálcico sólido (β -TCP);
- Hidroxiapatite (HA);
- Fosfato Cálcio bifásico (Composição variável de fosfato tricálcico e hidroxiapatite).

As matrizes de cimento de fosfato de cálcio (CPC), são como um pó, que misturado com água ou uma solução de fosfato, formam uma pasta. A pasta é então injetada e endurece *in situ*, com uma reação exotérmica mínima.

A reabsorção é mediada por processos celulares, incluindo os processos osteoclásticos e, à medida que o cimento é absorvido, existe deposição mineral, formando assim novo osso.

As vantagens deste biomaterial são o tempo de solidificação rápido, a moldabilidade, a biocompatibilidade, a osteocondutibilidade e existir uma relação entre a absorção e formação do novo osso (Larsson, 2010) e, as desvantagens são a fraca

osteoindução e propriedades mecânicas. As propriedades mecânicas vão ser influenciadas pela relação pó/líquido, influenciando também a porosidade do cimento. Uma maior densidade, irá deixar a matriz com melhores propriedades mecânicas, mas menor porosidade, afetando deste modo a formação do novo osso, já que este é formado no interior dos poros das matrizes (Ambard & Mueninghoff, 2006). Por outro lado, uma menor densidade, deixa o cimento com menos força, mas mais poroso. Deste modo, o cimento vai conseguir oferecer melhores condições de crescimento vascular, penetração celular (Ambard & Mueninghoff, 2006; Larsson, 2010).

Foi avaliada a formação de osso com células da medula óssea numa matriz de cimento de fosfato de cálcio, numa investigação desenvolvida por Hu e colegas (2014), onde se realizaram reparações de defeitos ósseos na mandíbula de cães, comparando três grupos: células estaminais da medula óssea com cimento fosfato cálcio (grupo 1); apenas cimentos fosfato cálcio (grupo 2); Grupo controlo (grupo 3). Concluíram que houve crescimento ósseo com os grupos 1 e 2, havendo substancialmente maior produção de tecido ósseo no grupo 1 (Hu et al., 2014).

As matrizes sólidas de Fosfato β -tricálcico (β -TCP) são usadas há muitos anos como matrizes na regeneração óssea, tendo sido a sua eficácia demonstrada em testes com animais, relativamente à regeneração óssea mandibular, tibial e femoral (Szpalski et al., 2011).

As apresentações destes biomateriais de β -TCP são compreendidas em grânulos, blocos e em fatias (Larsson, 2010). Como tal, também podem vir com diferentes características a nível da porosidade, sendo possível alterar os tamanhos dos poros das matrizes. Matrizes com maior porosidade, terão menos força e são mais rapidamente absorvidas, sendo necessário encontrar um valor de porosidade que consiga dar um rácio de absorção/formação de osso de 1:1 e ainda dar à matriz capacidade para aguentar as forças empregues no osso (von Doernberg et al., 2006). No entanto, este biomaterial tem como vantagens a sua osteocondutividade, biocompatibilidade, a absorção ser mediada por células e a possibilidade de determinação do tamanho dos poros (Facilidade em alterar a porosidade). Como desvantagens tem a sua osteoindutividade, fracas propriedades mecânicas (von Doernberg et al., 2006) e rápida biodegradação (J. Dong, Uemura, Shirasaki, & Tateishi, 2002).

Num estudo realizado por Shirasu e colegas (2010), foi avaliada a formação de osso com células da medula óssea numa matriz de β -TCP. Os investigadores fizeram a comparação entre 4 grupos: grupo 1 (matriz β -TCP e células da medula óssea); grupo 2

(enxerto com apenas as células da medula óssea); grupo 3 (utilização apenas da matriz β -TCP) e, grupo 4 (grupo de controlo). No grupo 1 e 2, houve proliferação celular e posterior formação de osso, havendo maior formação deste no grupo 1, já nos grupos 3 e 4, não houve qualquer tipo de formação óssea. Conclui-se assim, que as células usadas vão aumentar a osteoindutividade, diminuir a biodegradação e aumentar as propriedades mecânicas da matriz (Shirasu et al., 2010).

II. Hidroxiapatite (HA)

A hidroxiapatite (HA) está presente na matriz extracelular do osso e faz parte da composição inorgânica deste, sendo biocompatível com o organismo. As matrizes de Hidroxiapatite podem ter diferentes densidades, tamanhos, porosidades e forças, dependendo das propriedades que queremos dar (Szpalski et al., 2011).

O biomaterial de HA é altamente osteocondutivo e com osteogenicidade mínima, precisando de uma cultura de células para aumentar a sua osteogenicidade, tendo uma absorção lenta e é frágil. Outro grande problema é a sua incapacidade para manter as células na matriz, devido à falta de nutrientes, tendo sido necessário colmatar este problema com o desenvolvimento de uma matriz de hidroxiapatite trimodal (Buckley & O'Kelly, 2010).

A matriz composta por HA é constituída por dois tipos de poros, mesoporo, micróporo e por canais unidireccionais, havendo uma melhor difusão de oxigénio e melhor distribuição dos nutrientes necessários às células. Ao contrário, as células proliferavam e apenas formavam uma pequena camada de tecido ósseo. Com este modelo, existe ainda a formação de uma camada mais densa e, apresenta fraca eficiência na cultura de células, devendo-se à possibilidade de saturação dos canais unidireccionais com a suspensão celular (Buckley & O'Kelly, 2010).

O modelo matricial de HA veio ajudar a combater alguns pontos negativos. No entanto, as matrizes de Hidroxiapatite não são usadas puras e existem estudos de que estas são combinados com outros polímeros, a fim de deixar a matriz com maior capacidade para promover a adesão, proliferação e diferenciação celular (Szpalski et al., 2011).

III. Fosfato cálcio bifásico (BCP)

Os biomateriais de fosfato cálcio bifásico (BCP) são constituídos por hidroxiapatite e β -TCP (Szpalski et al., 2011). Dependendo das percentagens de cada biomaterial, a

reabsorção da matriz BCP e a liberação de íons para a vizinhança das células ósseas serão diferentes e assim, as propriedades biológicas ficam alteradas (Bouler, Pilet, Gauthier, & Verron, 2016). O biomaterial de BCP é muito osteocondutivo, no entanto mostra-se muito pouco osteoindutivo, como os outros materiais de fosfato de cálcio (Bouler et al., 2016; Szpalski et al., 2011).

Existem estudos que comprovam a formação de osso por parte deste material, e o autor Bouler et al (2016), afirma que esta estratégia juntamente com o uso de células e moléculas cuja finalidade é aumentar a osteogenicidade, podem pôr um fim à necessidade de transplantes autólogos de osso.

O biomaterial de BCP, embora seja considerado um excelente material, são precisos mais estudos de maneira a identificar o melhor rácio possível, entre as quantidades de HA e β -TCP (Bouler et al., 2016).

IV. Fosfato Octacálcio(OCP)

As matrizes compostas por fosfato de octacálcio começaram a ser introduzidos na regeneração óssea, devido à sua similaridade com a hidroxiapatite (HA) e, o fato de ser um precursor dos cristais de apatite (Fuji et al., 2009; Szpalski et al., 2011). O biomaterial de OCP, é composto por diferentes rácios de íons fosfato e cálcio, podendo apresentar diferentes características (Shiraishi et al., 2010; Suzuki & Anada, 2013).

O OCP é capaz de aumentar tanto a diferenciação osteoblástica *in vitro* como a própria regeneração óssea (Honda et al., 2009). Ainda, matrizes de OCP são mais reabsorvíveis e possuem um potencial de regeneração maior que os implantes matriciais de HA e β -TCP (Kamakura et al., 2007; Szpalski et al., 2011).

As matrizes compostas de OCP, apresentam-se muitas vezes em simultâneo com outros materiais, nomeadamente polímeros, como o caso do colagénio ou alginato (Fuji et al., 2009; Honda et al., 2009; Kamakura et al., 2007; Kamakura et al., 2006; Shiraishi et al., 2010).

V. Sulfato de cálcio(CS)

O sulfato de cálcio é o material mais antigo e o primeiro a ser usado na regeneração óssea, sendo conhecido por gesso (Szpalski et al., 2011; Wee & Thevendran, 2017). Existem em três formas diferentes, grânulos, cimento injetável e em blocos e, servem

nomeadamente para tratar pequenas fraturas ósseas, osteomielites e quistos nos ossos (Szpalski et al., 2011; Wee & Thevendran, 2017).

O sulfato de cálcio era usado em defeitos ósseos de pacientes com tuberculose, no entanto notaram que este material podia ser absorvido e substituído por osso. Ainda, outro mecanismo que encontraram no sulfato de cálcio é a desmineralização do tecido ósseo adjacente, estimulando assim a formação de novo osso (Wee & Thevendran, 2017). Contudo, esta interação com o osso adjacente advém da libertação de compostos que acidificam o meio, causando uma inflamação (J. Zhou et al., 2016). Um grande problema das matrizes com este material é o facto de este ser rapidamente absorvível, levando a que a quantidade absorvida seja superior à quantidade de osso formado (Wee & Thevendran, 2017; J. Zhou et al., 2016).

As propriedades mecânicas são muito fracas, sendo este usado em simultâneo com outros biomateriais, nomeadamente a hidroxiapatite, a fim de aumentar as forças de carga e, ainda a hidroxiapatite vem conferir maior biocompatibilidade (J. Zhou et al., 2016). Contudo, existe uma forma deste material, nano partículas de sulfato de cálcio, cuja a biocompatibilidade é melhorada, com melhores propriedades mecânicas, melhor osteocondutividade, proliferação e diferenciação osteoblastica, comparativamente ao sulfato de cálcio acima descrito, devendo ser esta uma boa aposta, aquando do uso de matrizes de sulfato de cálcio (Y. B. Park et al., 2011).

VI. Metais

Os metais são muito usados em implantes onde seja necessário o emprego de forças de cargas consideráveis, sendo a maior vantagem destes matérias as propriedades mecânicas (Arifvianto & Zhou, 2014; Hammouche, Hammouche, & McNicholas, 2012). Os implantes de metal sofreram algumas mudanças, conseguindo melhorar as características destes e são muito usados como parafusos, ou placas de titânio na própria cicatrização de fraturas direta (Sathyendra & Darowish, 2013). Contudo, os materiais usados são o aço inoxidável, cobalto-crómio, titânio e o tantálio. O aço inoxidável e o cobalto-crómio têm um custo menor e um desgaste menor, comparativamente aos outros dois (Hammouche et al., 2012).

Modificações têm sido feitas nestes materiais, para diminuir os pontos negativos destes implantes, aumentando a sua biocompatibilidade e a sua porosidade. Ainda, as atenções começam a ser dadas a outros materiais, como o caso do tantálio, nióbio,

zircônio e magnésio, devido às suas propriedades mecânicas e biológicas (Mantripragada, Lecka-Czernik, Ebraheim, & Jayasuriya, 2013). Sabe-se que ao aumentar a porosidade, as propriedades mecânicas reduzem, por isso espera-se alcançar um valor que consiga dar as melhores propriedades mecânicas e biológicas aos metais (Dabrowski, Swieszkowski, Godlinski, & Kurzydowski, 2010).

VII. Polímeros

Existem dois tipos de polímeros, os naturais e os sintéticos (Pina, Oliveira, & Reis, 2015; Susmita Bose, Mangal Roy, 2012). Os polímeros naturais englobam o colagénio, alginato, seda, ácido hialurónico e o quitosano. Nos polímeros sintéticos encontramos o ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA), policaprolactona (PCL) (Susmita Bose, Mangal Roy, 2012) e poliuretanos (Puppi, Chiellini, Piras, & Chiellini, 2010).

Os polímeros naturais têm maiores vantagens relativamente aos polímeros sintéticos, nomeadamente, na biocompatibilidade (Rao, Harini, Shadamarshan, Balagangadharan, & Selvamurugan, 2017; Swetha et al., 2010).

Os polímeros constituem um bom modelo de ligação e crescimento celular e, podem ainda estimular respostas imunitárias, sendo que a taxa de degradação destes biomateriais depende de enzimas do nosso organismo. Por norma, os polímeros sintéticos têm fracas propriedades mecânicas e são porosos, sendo necessário associar estes materiais a outros, de forma a ter uma matriz com as melhores propriedades mecânicas e biológicas (Sabir, Xu, & Li, 2009).

Matrizes poliméricas são usadas em simultâneo com outros materiais, nomeadamente partículas de HA ou de fosfato de cálcio, a fim de proporcionar as melhores características mecânicas e biológicas possíveis (A. M. Ferreira, Gentile, Chiono, & Ciardelli, 2012; Pina et al., 2015; Sabir et al., 2009).

Num estudo feito por Kane e colegas (2015), produziram uma matriz de hidroxiapatite-colagénio. A matriz foi preparada por compressão, o que a tornou mais porosa e com melhores propriedades mecânicas, condições difíceis de se reunir, mostrando-se permeável, osteocondutiva, osteogénica e angiogénica, *in vivo*. Por conseguinte, houve formação de tecido ósseo com esta matriz e células do tecido adiposo, em murganhos (Kane et al., 2015).

Noutro estudo efetuado por Villa e investigadores (2015), utilizaram-se também uma matriz de hidroxiapatite-colagénio em murganhos. Conseguiram também produzir

tecido ósseo e a matriz, mostrou ter qualidades mecânicas e biológicas, sendo esta uma boa escolha para futuros tratamentos a nível da regeneração óssea (Villa, Wang, Huang, Rowe, & Wei, 2015).

Os polímeros sintéticos são biodegradáveis e bioabsorvíveis e, já são usados na prática clínica, nomeadamente suturas. Os polímeros sintéticos são fabricados com propriedades físicas, químicas e mecânicas específicas, devido à possibilidade de utilização de vários co-polímeros com pesos moleculares diferentes, sendo facilmente produzidos com a forma e tamanho pretendidos (Puppi et al., 2010; Rezwan, Chen, Blaker, & Boccaccini, 2006). No entanto, os polímeros sintéticos podem dar problemas a nível da biocompatibilidade, como é o caso dos poliésteres e poliuretanos, que podem originar efeitos adversos, pondo em causa a regeneração óssea. Os polímeros sintéticos dão origem a produtos que podem acidificar o meio, havendo uma posterior inflamação e danificação do tecido e, ainda há dificuldade na adesão celular (Puppi et al., 2010; Sabir et al., 2009).

Há vantagens na utilização destes polímeros juntamente com outros materiais, nomeadamente, o fosfato de cálcio, uma vez que a presença de uma parte mineral alcalina, irá neutralizar a acidez dos produtos de degradação e, também, é possível colmatar as falhas a nível de porosidade e propriedades mecânicas existentes (Kretlow & Mikos, 2007).

Um estudo efetuado por Zhang e colegas (2016), envolveu a comparação de três grupos de estudo, com matrizes diferentes: Grupo 1 (Matriz de PLA/HA); Grupo 2 (Matriz de β -TCP) e Grupo 3 (Matriz de osso desmineralizado (DBM)). Concluíram que a matriz de PLA/HA tinha melhor biocompatibilidade e bioatividade *in vitro*. *In vivo*, a mesma matriz mostrou ser mais osteoindutiva, levando a um aumento de formação de osso, comparativamente às outras matrizes usadas. Contudo, esta matriz mostrou uma pequena resposta inflamatória, devido à HA não ter conseguido neutralizar todos os produtos de degradação de PLA, precisando de mais estudos para evitar tal evento (Zhang et al., 2016).

VIII. Biovidro activo

O biovidro é um material sintético existente há muito tempo, tendo sido descoberto por Hench, em 1969 (Jones, 2015; Rezwan et al., 2006). Este biomaterial tem na sua constituição cálcio (Ca), fosforo (P), sílica (Si) e sódio (Na) (Xynos et al., 2000).

Inicialmente, sabia-se que este material era bioativo, osteocondutor e antibacteriano (Aurégan & Bégué, 2015). Mais tarde, veio a descobrir-se que este ajudava na vascularização, na adesão, crescimento e diferenciação dos osteoblastos (Rezwan et al., 2006).

Uma característica do biovidro ativo é a produção de produtos que advêm da sua dissolução e que controlam a osteogénese e a produção de fatores de crescimento. A sílica tem um papel importante na mineralização, havendo estudos que ponham a possibilidade de substituir o cálcio por sílica nas matrizes de HA sintéticas (Aurégan & Bégué, 2015).

O biovidro não é um bom material para alojar células, sendo necessário juntar outro componente biodegradável, de maneira a que as células adiram à matriz (X. Wang et al., 2014).

IX. Dentina

A dentina é um tecido conjuntivo mineralizado constituído por colagénio tipo I e hidroxiapatite, tal como o osso. O que diferencia estes dois tecidos é que a dentina se apresenta mais mineralizada, tendo na sua constituição 70-75% de hidroxiapatite, enquanto que o osso apenas apresenta 65%. Ainda, na sua composição apresentam fatores de crescimento, capazes de desencadear respostas biológicas como a adesão, a proliferação e a diferenciação celular (Kim, Keun, Kim, Um, & Murat, 2013).

A constituição da dentina também apresenta proteínas não colagénicas, nomeadamente a osteocalcina, a osteopontina, a sialoproteína da dentina, a fosforina dentinária (DPP), e proteínas morfogénicas (BMP) (Ravindran & George, 2015). As fosforinas dentinárias (DPP), também pode ser designada de proteína da matriz dentinária 2 (DMP-2) e tem como principal função intervir no processo da mineralização, devido à sua capacidade de se ligar ao colagénio tipo I e promover a nucleação e crescimento dos cristais de hidroxiapatite, sendo esta benéfica aquando do uso de dentina para regeneração óssea (Lobato, 2016; Ravindran & George, 2015). Já a sialoproteína dentinária, o papel na dentina é desconhecido, no entanto pode ter um papel importante na promoção da nucleação e adesão de células à matriz extracelular, promovendo a osteogénese, podendo

esta proteína ser importante na formação do novo osso (Fujisawa & Tamura, 2012; Lobato, 2016).

A dentina, tendo uma constituição e estrutura semelhante à do osso, levou a que os investigadores estudassem o seu potencial de utilização como um biomaterial na regeneração óssea, sendo o seu principal foco na reabilitação oral com perda óssea (Kim et al., 2013). A matriz de dentina é um excelente biomaterial para regeneração óssea, pois tem na sua composição fatores de crescimentos, proteínas não colagénicas e minerais, conferindo um carácter biocompatível, osteoindutivo, osteogénico e osteocondutivo (Andersson, 2010; Qin et al., 2014; Saeed, Gataa, & Garib, 2015).

Num estudo realizado por Andersson, em 2010, houve a colocação de excertos de blocos de dentina na tíbia de coelhos, sendo feita a recolha de dados aos três e seis meses. Aos três meses, viu-se que 86% da dentina estava fundida no osso e que houve formação de osso em 51% do excerto. Aos seis meses, 98% do osso estava fundido com o osso da tíbia e 77% do excerto constituía novo osso (Andersson, 2010).

Já no estudo de Saeed, Gataa e Garib, em 2015, realizado em coelhos, foi feita uma comparação entre um grupo experimental, onde houve a colocação de enxertados com particulado de dentina em buracos de 5 mm de diâmetro no fémur e coelhos com os danos no fémur sem qualquer substituo ósseo (grupo controlo). Os dados foram recolhidos às duas, quatro e seis semanas. O grupo controlo mostrou formação de osso trabecular fino, com atividade osteoblástica e o particulado de dentina ainda visível, às seis semanas. Por outro lado, no grupo experimental, às seis semanas, a dentina tinha sido completamente substituída por novo osso (Saeed et al., 2015).

Mais recentemente, em 2016, num estudo efetuado no Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, por Lobato, houve um uso de particulado autógeno de dentina mineralizado, como biomaterial em dez casos de regeneração óssea, para posterior colocação de implantes. Os pacientes tinham perda óssea, sendo necessário aumentar o tecido ósseo alveolar, de maneira a que os implantes tivessem uma boa ancoragem. O uso da dentina, enquanto substituto ósseo demonstrou ser um excelente biomaterial para formação de novo osso, com boas propriedades osteocondutoras, osteoindutoras e boa integração tecidular (Lobato, 2016).

CONCLUSÃO

O osso é um órgão dinâmico com mecanismos bem orquestrados e que estão em sincronia para uma remodelação diária do seu tecido ósseo, com micro e macroestruturas bem organizadas, a fim de proporcionar as melhores características mecânicas, para suporte e proteção do nosso corpo.

Da matriz orgânica, o colagénio tipo I é o que se apresenta em maior quantidade e a primeira linha estrutural e de suporte a um bom desenvolvimento ósseo (Garnero, 2015; Viguet-Carrin et al., 2006). Algum problema relacionado com a produção das fibras, poderá trazer consequências ao nível do metabolismo, estrutura e suporte do osso. Adicionalmente, as proteínas não colagénicas são de grande importância, na medida em que direcionam a mineralização e permitem a ligação entre as fibras de colagénio e os cristais de hidroxiapatite (Fujisawa & Tamura, 2012).

Da matriz inorgânica fazem parte os iões de cálcio e fosfato, sendo estes depois orientados na matriz orgânica a formar um cristal, que segue a orientação das fibrilhas de colagénio, mineralizando-as e conferindo o carácter de rigidez do tecido ósseo.

A regeneração acontece ao nível de microfraturas e de macrofraturas, com cicatrização através de processos bem definidos. Todavia, esta regeneração pode falhar ou apresentar problemas, sendo necessário a aplicação de diferentes estratégias, seja através de enxertos ósseos ou enxertos de matriz osteomiméticas com ou sem cultura de células mesenquimais estaminais. O complexo formado pelas matrizes e células específicas vão conferir propriedades osteogénicas, osteoindutivas, osteocondutiva, mecânicas e vasculogénicas. Existem fatores que contribuem negativamente para a constituição óssea, refletindo-se ao nível da regeneração, devendo ser de extrema importância, um controlo rigoroso das doenças crónicas, nomeadamente a Diabetes Mellitus e a hipertensão arterial, a fim de proporcionar as melhores condições a uma boa regeneração óssea (Bastos et al., 2013; Sathyendra & Darowish, 2013).

A área da regeneração óssea guiada é uma área com algumas dificuldades, não existindo uma matriz com as características ideais para ser empregue em humanos. A dificuldade manifesta-se muitas vezes na porosidade da matriz, sendo necessário achar uma boa razão entre esta característica e as propriedades mecânicas. De facto uma matriz muito porosa é mais fraca mecanicamente e uma matriz pouco porosa consegue ser mais forte, todavia menos osteogénica. Por outro lado, a dentina é um bom biomaterial, tendo

sido verificado o seu uso com sucesso na regeneração óssea alveolar (Lobato, 2016; Saeed et al., 2015)

Em suma, são precisos mais estudos, em seres humanos no caso de fraturas em ossos longos dos membros inferiores e superiores, a fim de encontrar uma matriz biomimética que consiga dar propriedades mecânicas adequadas à regeneração óssea.

BIBLIOGRAFIA

- Agata, H., Asahina, I., Yamazaki, Y., Uchida, M., Shinohara, Y., Honda, M. J., ... Ueda, M. (2007). Effective Bone Engineering with Periosteum-derived Cells. *Journal of Dental Research*, 86(1), 79–83. <https://doi.org/10.1177/154405910708600113>
- Ambard, A. J., & Mueninghoff, L. (2006). Calcium phosphate cement: Review of mechanical and biological properties. *Journal of Prosthodontics*, 15(5), 321–328. <https://doi.org/10.1111/j.1532-849X.2006.00129.x>
- Andersson, L. (2010). Dentin xenografts to experimental bone defects in rabbit tibia are ankylosed and undergo osseous replacement. *Dental Traumatology*, 26(5), 306–310. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.2010.00912.x>
- Andor, G. K., Numminen, J., Wolff, J., Thesleff, T., Miettinen, A., Tuovinen, V. J., ... Ohman, J. (2014). Adipose Stem Cells Used to Reconstruct 13 Cases With Cranio-Maxillofacial Hard-Tissue Defects. *Stem Cells Translational Medicine*, 3, 530–540. <https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0173>
- Arifvianto, B., & Zhou, J. (2014). Fabrication of metallic biomedical scaffolds with the space holder method: A review. *Materials*, 7(5), 3588–3622. <https://doi.org/10.3390/ma7053588>
- Arner, J. W., & Santrock, R. D. (2014). A Historical Review of Common Bone Graft Materials in Foot and Ankle Surgery. *Foot & Ankle Specialist*, 7(2), 143–151. <https://doi.org/10.1177/1938640013516358>
- Arteaga-Solis, E., Sui-Arteaga, L., Kim, M., Schaffler, M. B., Jepsen, K. J., Pleshko, N., & Ramirez, F. (2011). Material and mechanical properties of bones deficient for fibrillin-1 or fibrillin-2 microfibrils. *Matrix Biology*, 30(3), 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2011.03.004>
- Aurégan, J.-C., & Bégué, T. (2015). Bioactive glass for long bone infection: a systematic review. *Injury*, 46, S3–S7. [https://doi.org/10.1016/S0020-1383\(15\)30048-6](https://doi.org/10.1016/S0020-1383(15)30048-6)
- Barberi, T., Willis, L. M., Socci, N. D., & Studer, L. (2005). Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. *PLoS Medicine*, 2(6), 0554–0560. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020161>
- Bastos, M. F., Vasconcelos de Araújo, I., Vilhena Brilhante, F., Pires, A. G., Dias Gonçalves, T. E., Napimoga, M. H., ... Duarte, P. M. (2013). Effects of lercanidipine on bone density and bone repair in spontaneously hypertensive rats. *Implant dentistry*, 22(1), 49–54. <https://doi.org/10.1097/ID.0b013e3182777650>

- Beil, F. T., Barvencik, F., Gebauer, M., Seitz, S., Rueger, J. M., Ignatius, A., ... Amling, M. (2010). Effects of Estrogen on Fracture Healing in Mice. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*, 69(5), 1259–1265. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e3181c4544d>
- Berendsen, A. D., & Olsen, B. R. (2015). Bone development. *Bone*, 80, 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.04.035>
- Bernards, M. T., Qin, C., & Jiang, S. (2008). MC3T3-E1 cell adhesion to hydroxyapatite with adsorbed bone sialoprotein, bone osteopontin, and bovine serum albumin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 64(2), 236–247. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.01.025>
- Bhattacharya, I., Ghayor, C., & Weber, F. E. (2016). The Use of Adipose Tissue-Derived Progenitors in Bone Tissue Engineering - a Review. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 43(5), 336–343. <https://doi.org/10.1159/000447494>
- Boskey, A. L., Spevak, L., Paschalis, E., Doty, S. B., & McKee, M. D. (2002). Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone. *Calcified Tissue International*, 71(2), 145–154. <https://doi.org/10.1007/s00223-001-1121-z>
- Bouler, J. M., Pilet, P., Gauthier, O., & Verron, E. (2016). Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: A review of biological response. *Acta Biomaterialia*, 53, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.076>
- Bradshaw, A. D. (2009). The role of SPARC in extracellular matrix assembly. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 3(3–4), 239–246. <https://doi.org/10.1007/s12079-009-0062-6>
- Buckley, C. T., & O’Kelly, K. U. (2010). Fabrication and characterization of a porous multidomain hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering investigations. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 93(2), 459–467. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31603>
- Burr, D. B., & Allen, M. R. (2014). *Basic and Applied Bone Biology*. Elsevier.
- Burr, D., & Matthew, A. (2013). *Basic and Applied Bone Biology* (1st editio). Elsevier.
- Campana, V., Milano, G., Pagano, E., Barba, M., Cicione, C., Salonna, G., ... Logroscino, G. (2014). Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(10), 2445–2461. <https://doi.org/10.1007/s10856-014-5240-2>
- Castillo, R. C., Bosse, M. J., MacKenzie, E. J., & Patterson, B. M. (2005). Impact of

- Smoking on Fracture Healing and Risk of Complications in Limb-Threatening Open Tibia Fractures. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 19(3), 151–157. <https://doi.org/10.1097/00005131-200503000-00001>
- Chang, J. B., & Lee, J. C. (2016). U . S . Department of Veterans Affairs Realistic Strategy in Bone Regeneration ?, 3(1), 3–6.
- Chang, S. W., Shefelbine, S. J., & Buehler, M. J. (2012). Structural and mechanical differences between collagen homo-and heterotrimers: Relevance for the molecular origin of brittle bone disease. *Biophysical Journal*, 102(3), 640–648. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.11.3999>
- Chiarello, E., Cadossi, M., Tedesco, G., Capra, P., Calamelli, C., Shehu, A., & Giannini, S. (2013). Autograft, allograft and bone substitutes in reconstructive orthopedic surgery. *Aging Clinical and Experimental Research*, 25(1 SUPPL.), 101–103. <https://doi.org/10.1007/s40520-013-0088-8>
- Claes, L., Recknagel, S., & Ignatius, A. (2012). Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nature Reviews Rheumatology*, 8(3), 133–143. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.1>
- Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 3 Suppl 3, 131–139. <https://doi.org/10.2215/CJN.04151206>
- Coe, L. M., Irwin, R., Lippner, D., & McCabe, L. R. (2011). The bone marrow microenvironment contributes to type I diabetes induced osteoblast death. *Journal of Cellular Physiology*, 226(2), 477–483. <https://doi.org/10.1002/jcp.22357>
- Concu, R., Podda, G., Gonzalez-Diaz, H., & Shen, B. (2011). Review of Computer-Aided Models for Predicting Collagen Stability. *Current Computer-Aided Drug Design*, 7, 287–303. <https://doi.org/10.2174/157340911798260269>
- Dabrowski, B., Swieszkowski, W., Godlinski, D., & Kurzydowski, K. J. (2010). Highly porous titanium scaffolds for orthopaedic applications. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 95(1), 53–61. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31682>
- Dai, R., Wang, Z., Samanipour, R., Koo, K., & Kim, K. (2016). Adipose-Derived Stem Cells for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Stem Cells International*, 2016, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2016/6737345>
- De Bari, C., Dell'Accio, F., Vanlauwe, J., Eyckmans, J., Khan, I. M., Archer, C. W., ... Luyten, F. P. (2006). Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells

- demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis and Rheumatism*, 54(4), 1209–1221. <https://doi.org/10.1002/art.21753>
- Delany, A. M., Amling, M., Priemel, M., Howe, C., Baron, R., & Canalis, E. (2000). Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation*, 105(7), 915–923. <https://doi.org/10.1172/JCI7039>
- Delany, A. M., McMahon, D. J., Powell, J. S., Greenberg, D. A., & Kurland, E. S. (2008). Osteonectin/SPARC polymorphisms in Caucasian men with idiopathic osteoporosis. *Osteoporosis International*, 19(7), 969–978. <https://doi.org/10.1007/s00198-007-0523-9>
- Desai, N., Rambhia, P., & Gishto, A. (2015). Human embryonic stem cell cultivation: historical perspective and evolution of xeno-free culture systems. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0005-4>
- Dimitriou, R., Jones, E., McGonagle, D., & Giannoudis, P. V. (2011). Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine*, 9(1), 66. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-66>
- Ding, D.-C., Chang, Y.-H., Shyu, W.-C., & Lin, S.-Z. (2015). Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. *Cell transplantation*, 24(3), 339–47. <https://doi.org/10.3727/096368915X686841>
- Dong, J., Uemura, T., Shirasaki, Y., & Tateishi, T. (2002). Promotion of bone formation using highly pure porous β -TCP combined with bone marrow-derived osteoprogenitor cells. *Biomaterials*, 23(23), 4493–4502. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00193-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00193-X)
- Dong, X. N., Qin, A., Xu, J., & Wang, X. (2011). In situ accumulation of advanced glycation endproducts (AGEs) in bone matrix and its correlation with osteoclastic bone resorption. *Bone*, 49(2), 174–183. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.04.009>
- Donigan, J., Fredericks, D., Nepola, J., & Smucker, J. (2012). The effect of transdermal nicotine on fracture healing in a rabbit model. *Journal of orthopaedic ...*, 26(12), 724–727. Obtido de http://journals.lww.com/jorthotrauma/Abstract/2012/12000/The_Effect_of_Transdermal_Nicotine_on_Fracture.12.aspx
- Dougall, W. C., Glaccum, M., Charrier, K., Rohrbach, K., Brasel, K., De Smedt, T., ... Schuh, J. (1999). RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes and Development*, 13(18), 2412–2424. <https://doi.org/10.1101/gad.13.18.2412>

- Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., ... Karsenty, G. (1996). Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/382448a0>
- Dumic-cule, I., Pecina, M., & Jelic, M. (2015). Biological aspects of segmental bone defects management, 1005–1011. <https://doi.org/10.1007/s00264-015-2728-4>
- Egol, K. A., Nauth, A., Lee, M., Pape, H., Watson, J. T., & Borrelli, J. (2015). Bone Grafting : Sourcing , Timing , Strategies , and Alternatives, 29(12), 10–14.
- Ehrler, D. M., & Vaccaro, a R. (2000). The use of allograft bone in lumbar spine surgery. *Clinical orthopaedics and related research*, (371), 38–45. <https://doi.org/10.1097/00003086-200002000-00005>
- Eriksen, E. F. (2010). Cellular mechanisms of bone remodeling. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 11(4), 219–227. <https://doi.org/10.1007/s11154-010-9153-1>
- Fawcett, D. W. (1995). *Tratado de Histologia* (12^o edição). Interamericana.
- Fedarko, N. S., Sponseller, P. D., & Shapiro, J. R. (1996). Long-term extracellular matrix metabolism by cultured human osteogenesis imperfecta osteoblasts. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 11(6), 800–5. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650110611>
- Feng, X., & McDonald, J. M. (2011). Disorders of bone remodeling. *Annual review of pathology*, 6, 121–45. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130203>
- Ferreira, A. M., Gentile, P., Chiono, V., & Ciardelli, G. (2012). Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*, 8(9), 3191–3200. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.06.014>
- Ferreira, T., Silva, D., Lúcia, A., & Penna, B. (2012). Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais Chemical characteristics and functional properties of collagen. *Artigo Original/Original Article Rev Inst Adolfo Lutz*, 71(3), 530–9.
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
- Fuji, T., Anada, T., Honda, Y., Shiwaku, Y., Koike, H., Kamakura, S., ... Suzuki, O. (2009). Octacalcium phosphate-precipitated alginate scaffold for bone regeneration. *Tissue engineering. Part A*, 15(11), 3525–35. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0048>

- Fujisawa, R., & Tamura, M. (2012). Acidic bone matrix and their roles in calcification. *Frontiers in Bioscience*, (17), 1891–1903.
- Gamie, Z., MacFarlane, R. J., Tomkinson, A., Moniakis, A., Tran, G. T., Gamie, Y., ... Tsiridis, E. (2014). Skeletal tissue engineering using mesenchymal or embryonic stem cells: clinical and experimental data. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 14(11), 1611–1639. <https://doi.org/10.1517/14712598.2014.945414>
- Garnero, P. (2015). The Role of Collagen Organization on the Properties of Bone. *Calcified Tissue International*, 97(3), 229–240. <https://doi.org/10.1007/s00223-015-9996-2>
- Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2010). *Concise Histology*. Saunders Elsevier.
- Gericke, A., Qin, C., Spevak, L., Fujimoto, Y., Butler, W. T., Sørensen, E. S., & Boskey, A. L. (2005). Importance of Phosphorylation for Osteopontin Regulation of Biomineralization. *Calcified Tissue International*, 77(1), 45–54. <https://doi.org/10.1007/s00223-004-1288-1>
- Giannoudis, P. V., Hak, D., Sanders, D., Donohoe, E., Tosounidis, T., & Bahney, C. (2015). Inflammation, Bone Healing, and Anti-Inflammatory Drugs. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 29(12), S6–S9. <https://doi.org/10.1097/BOT.0000000000000465>
- Gibon, E., Lu, L. Y., Nathan, K., & Goodman, S. B. (2017). Inflammation, ageing, and bone regeneration. *Journal of Orthopaedic Translation*, 10(4), 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2017.04.002>
- Gordon, M. K., & Hahn, R. A. (2010). Collagens. *Cell and Tissue Research*, 339(1), 247–257. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0844-4>
- Gusić, N., Ivković, A., VaFaye, J., Vukasović, A., Ivković, J., Hudetz, D., & Janković, S. (2014). Nanobiotechnology and bone regeneration: A mini-review. *International Orthopaedics*, 38(9), 1877–1884. <https://doi.org/10.1007/s00264-014-2412-0>
- Hadjizadeh, A., & Doillon, C. J. (2010). Directional migration of endothelial cells towards angiogenesis using polymer fibres in a 3D co-culture system. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 4(7), 524–531. <https://doi.org/10.1002/term>
- Hammouche, S., Hammouche, D., & McNicholas, M. (2012). Biodegradable Bone Regeneration Synthetic Scaffolds: in Tissue Engineering. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 7(2), 134–142. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/157488812799219018>

- Hayashi, T., Misawa, H., Nakahara, H., Noguchi, H., Yoshida, A., Kobayashi, N., ... Ozaki, T. (2012). Transplantation of osteogenically differentiated mouse iPS cells for bone repair. *Cell Transplantation*, 21(2–3), 591–600. <https://doi.org/10.3727/096368911X605529>
- Holm, E., Aubin, J. E., Hunter, G. K., Beier, F., & Goldberg, H. A. (2015). Loss of bone sialoprotein leads to impaired endochondral bone development and mineralization. *Bone*, 71, 145–154. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.10.007>
- Honda, Y., Anada, T., Kamakura, S., Morimoto, S., Kuriyagawa, T., & Suzuki, O. (2009). The effect of microstructure of octacalcium phosphate on the bone regenerative property. *Tissue engineering. Part A*, 15(8), 1965–73. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0300>
- Hosseinpour, S., Ghazizadeh Ahsaie, M., Rezai Rad, M., Baghani, M. taghi, Motamedian, S. R., & Khojasteh, A. (2017). Application of selected scaffolds for bone tissue engineering: a systematic review. *Oral and Maxillofacial Surgery*, 21(2), 109–129. <https://doi.org/10.1007/s10006-017-0608-3>
- Hsu, H., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Solovyev, I., Colombero, A., Timms, E., ... Boyle, W. J. (1999). Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7), 3540–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3540>
- Hu, Y., Liu, X., Shen, J., He, J., & Chen, Q. (2014). [Experimental study of canine bone marrow mesenchymal stem cells combined with calcium phosphate cement for repair of mandibular bone defects in Beagle dogs]. *Shanghai kou qiang yi xue = Shanghai journal of stomatology*, 23(4), 402–8. Obtido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25338788>
- Iyyanki, T., Hubenak, J., Liu, J., Chang, E. I., Beahm, E. K., & Zhang, Q. (2015). Harvesting technique affects adipose-derived stem cell yield. *Aesthetic Surgery Journal*, 35(4), 467–476. <https://doi.org/10.1093/asj/sju055>
- Jakoi, A. M., Iorio, J. A., & Cahill, P. J. (2015). Autologous bone graft harvesting: a review of grafts and surgical techniques. *Musculoskeletal Surgery*, 99(3), 171–178. <https://doi.org/10.1007/s12306-015-0351-6>
- Jiao, H., Xiao, E., & Graves, D. T. (2015). Diabetes and Its Effect on Bone and Fracture Healing. *Current Osteoporosis Reports*, 13(5), 327–335. <https://doi.org/10.1007/s11914-015-0286-8>

- Jin, G.-Z., Kim, T.-H., Kim, J.-H., Won, J.-E., Yoo, S.-Y., Choi, S.-J., ... Kim, H.-W. (2013). Bone tissue engineering of induced pluripotent stem cells cultured with macrochanneled polymer scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101A(5), 1283–1291. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34425>
- Jones, J. R. (2015). Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia*, 23(S), S53–S82. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.07.019>
- Josse, R. G. (2009). The Role of RANK/RANKL/OPG Pathway in Bone Loss: New Insights. Obtido de <https://healthplexus.net/article/bone-biology-and-role-rankranklologp-pathway>
- Kamakura, S., Sasaki, K., Homma, T., Honda, Y., Anada, T., Echigo, S., & Suzuki, O. (2007). The primacy of octacalcium phosphate collagen composites in bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 83A(3), 725–733. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31332>
- Kamakura, S., Sasaki, K., Honda, Y., Anada, T., & Suzuki, O. (2006). Octacalcium phosphate combined with collagen orthotopically enhances bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 79B(2), 210–217. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30531>
- Kane, R. J., Weiss-Bilka, H. E., Meagher, M. J., Liu, Y., Gargac, J. A., Niebur, G. L., ... Roeder, R. K. (2015). Hydroxyapatite reinforced collagen scaffolds with improved architecture and mechanical properties. *Acta Biomaterialia*, 17(January), 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.01.031>
- Kasner, E., Hunter, C. A., Ph, D., Kariko, K., & Ph, D. (2013). NIH Public Access, 70(4), 646–656. <https://doi.org/10.1002/ana.22528>.Toll-like
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., & Bieback, K. (2006). Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells*, 24(5), 1294–1301. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0342>
- Kim, Y.-K., Keun, J., Kim, K., Um, I., & Murat, M. (2013). Healing Mechanism and Clinical Application of Autogenous Tooth Bone Graft Material. Em *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications*. InTech. <https://doi.org/10.5772/53200>
- Komatsu, D. E., & Warden, S. J. (2010). The control of fracture healing and its therapeutic targeting: Improving upon nature. *Journal of Cellular Biochemistry*, 109(2), 302–311. <https://doi.org/10.1002/jcb.22418>
- Kong, Y. Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H. L., Timms, E., Capparelli, C., ... Penninger,

- J. M. (1999). OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 397(6717), 315–323. <https://doi.org/10.1038/16852>
- Kretlow, J. D., & Mikos, A. G. (2007). Review: Mineralization of Synthetic Polymer Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Tissue Engineering*, 13(5), 927–938. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0394>
- Kuznetsov, S. A., Cherman, N., & Robey, P. G. (2011). In Vivo Bone Formation by Progeny of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells and Development*, 20(2), 269–287. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0501>
- Kwon, B. S., Wang, S., Udagawa, N., Haridas, V., Lee, Z. H., Kim, K. K., ... Ni, J. (1998). TR1, a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, induces fibroblast proliferation and inhibits osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB*.
- Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H. L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., ... Boyle, W. J. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 93(2), 165–176. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81569-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81569-X)
- Landis, W. J., & Jacquet, R. (2013). Association of calcium and phosphate ions with collagen in the mineralization of vertebrate tissues. *Calcified Tissue International*, 93(4), 329–337. <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9725-7>
- Larsson, S. (2010). Calcium phosphates: what is the evidence? *Journal of orthopaedic trauma*, 24 Suppl 1(3), S41–S45. <https://doi.org/10.1097/BOT.0b013e3181cec472>
- Lee, S.-W., & Kim, S.-G. (2014). Membranes for the Guided Bone Regeneration. *Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery*, 36(6), 239–246. <https://doi.org/10.14402/jkamprs.2014.36.6.239>
- Li, J., Sarosi, I., Yan, X. Q., Morony, S., Capparelli, C., Tan, H. L., ... Boyle, W. J. (2000). RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(4), 1566–71. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.4.1566>
- Liu, G., Zhao, L., Zhang, W., Cui, L., Liu, W., & Cao, Y. (2008). Repair of goat tibial defects with bone marrow stromal cells and β -tricalcium phosphate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(6), 2367–2376. <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3348-3>

- Liu, W., & Zhang, X. (2015). Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (Review). *Molecular Medicine Reports*, 11(5), 3212–3218. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3152>
- Lobato, B. dos R. (2016). *ESTUDO PILOTO PROSPETIVO – SÉRIE DE CASOS DE AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO ÓSSEA ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE UM PARTICULADO DE DENTINA AUTÓGENA*. Instituto Ciências da Saude Egas Moniz.
- Lou, X. (2015). Induced pluripotent stem cells as a new strategy for osteogenesis and bone regeneration. *Stem Cell Reviews and Reports*, 11(4), 645–651. <https://doi.org/10.1007/s12015-015-9594-8>
- Lowe, J., & Stevens, A. (2005). *Human Histology* (3^o edição). Elsevier Mosby.
- Makareeva, E., Han, S., Vera, J. C., Sackett, D. L., Holmbeck, K., Phillips, C. L., ... Leikin, S. (2010). Carcinomas contain a matrix metalloproteinase-resistant isoform of type I collagen exerting selective support to invasion. *Cancer Research*, 70(11), 4366–4374. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4057>
- Mantripragada, V. P., Lecka-Czernik, B., Ebraheim, N. A., & Jayasuriya, A. C. (2013). An overview of recent advances in designing orthopedic and craniofacial implants. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 101(11), 3349–3364. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34605>
- Marolt, D., Campos, I. M., Bhumiratana, S., Koren, A., Petridis, P., Zhang, G., ... Vunjak-Novakovic, G. (2012). Engineering bone tissue from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(22), 8705–8709. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201830109>
- Marsell, R., & Einhorn, T. A. (2011a). The biology of fracture healing. *Injury*, 42(6), 551–555. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.03.031>
- Marsell, R., & Einhorn, T. A. (2011b). The biology of fracture healing. *Injury*, 42(6), 551–555. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.03.031>
- McCarthy, A. D., Uemura, T., Etcheverry, S. B., & Cortizo, A. M. (2004). Advanced glycation endproducts interfere with integrin-mediated osteoblastic attachment to a type-I collagen matrix. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(5), 840–848. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.09.006>
- Mendoza-Londono, R., Fahiminiya, S., Majewski, J., Tétreault, M., Nadaf, J., Kannu, P., ... Rauch, F. (2015). Recessive Osteogenesis Imperfecta Caused by Missense

- Mutations in SPARC. *American Journal of Human Genetics*, 96(6), 979–985.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.04.021>
- Mennan, C., Wright, K., Bhattacharjee, A., Balain, B., Richardson, J., & Roberts, S. (2013). Isolation and Characterisation of Mesenchymal Stem Cells from Different Regions of the Human Umbilical Cord, 2013.
- Mescher, A. L. (2013). *Junqueira's Basic Histology Text & Atlas* (13^o edição). McGraw-Hill.
- Morgan, S., Poundarik, A. A., & Vashishth, D. (2015). Do Non-collagenous Proteins Affect Skeletal Mechanical Properties? *Calcified Tissue International*, 97(3), 281–291. <https://doi.org/10.1007/s00223-015-0016-3>
- Moskala, E. J. (2003). The effect of gamma irradiation on thermoplastic copolyesters. *Medical device technology*, 14(3), 12–16.
- Nakashima, T., Kobayashi, Y., Yamasaki, S., Kawakami, A., Eguchi, K., Sasaki, H., & Sakai, H. (2000). Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*, 275(3), 768–775. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3379>
- Nancy, A. (2012). *TEN CATE'S ORAL HISTOLOGY, 8TH EDITION*. (Elsevier, Ed.) (12th editi).
- Nayak, D., Roth, T. L., & McGavern, D. B. (2014). HHS Public Access, 43(2), 367–402. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120240>.Microglia
- Nistala, H., Lee-Arteaga, S., Smaldone, S., Siciliano, G., Carta, L., Ono, R. N., ... Ramirez, F. (2010). Fibrillin-1 and -2 differentially modulate endogenous TGF- β and BMP bioavailability during bone formation. *Journal of Cell Biology*, 190(6), 1107–1121. <https://doi.org/10.1083/jcb.201003089>
- Ohnishi, H., Oda, Y., Aoki, T., Tadokoro, M., Katsube, Y., Ohgushi, H., ... Yuba, S. (2012). A comparative study of induced pluripotent stem cells generated from frozen, stocked bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 6(4), 261–271. <https://doi.org/10.1002/term.428>
- Orgel, J. P. R. O., Irving, T. C., Miller, A., & Wess, T. J. (2006). Microfibrillar structure of type I collagen in situ. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24), 9001–9005. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502718103>
- Oryan, A., Alidadi, S., Moshiri, A., & Maffulli, N. (2014). Bone regenerative medicine:

- classic options, novel strategies, and future directions. *Journal of orthopaedic surgery and research*, 9(1), 18. <https://doi.org/10.1186/1749-799X-9-18>
- Oryan, A., Monazzah, S., & Bigham-Sadegh, A. (2015a). Bone injury and fracture healing biology. *Biomedical and environmental sciences : BES*, 28(1), 57–71. <https://doi.org/10.3967/bes2015.006>
- Oryan, A., Monazzah, S., & Bigham-Sadegh, A. (2015b). Bone injury and fracture healing biology. *Biomedical and environmental sciences : BES*, 28(1), 57–71. <https://doi.org/10.3967/bes2015.006>
- Park, J. J., Hershman, S. H., & Kim, Y. H. (2013). Updates in the Use of Bone Grafts in the Lumbar Spine, 71(1), 39–48.
- Park, Y. B., Mohan, K., Al-Sanousi, A., Almaghrabi, B., Genco, R. J., Swihart, M. T., & Dziak, R. (2011). Synthesis and characterization of nanocrystalline calcium sulfate for use in osseous regeneration. *Biomedical Materials*, 6(5), 55007. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/6/5/055007>
- Perry, R. J., Samuel, V. T., Petersen, K. F., Shulman, G. I., Haven, N., & Haven, N. (2015). HHS Public Access, 510(7503), 84–91. <https://doi.org/10.1038/nature13478>.The
- Pina, S., Oliveira, J. M., & Reis, R. L. (2015). Natural-based nanocomposites for bone tissue engineering and regenerative medicine: A review. *Advanced Materials*, 27(7), 1143–1169. <https://doi.org/10.1002/adma.201403354>
- Ping Wang, Xian Liu, Liang Zhao, Michael D. Weir, Jirun Sun, Wenchuan Chen, Y. M. and H. H. k. X. (2015). Bone tissue engineering via human induced pluripotent, umbilical cord and bone marrow mesenchymal stem cells in rat cranium, 150(2), 137–143. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2014.1086>.Feasibility
- Poundarik, A. A., Diab, T., Sroga, G. E., Ural, A., Boskey, A. L., Gundberg, C. M., & Vashishth, D. (2012). Dilatational band formation in bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(47), 19178–19183. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201513109>
- Puppi, D., Chiellini, F., Piras, A. M., & Chiellini, E. (2010). Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science*, 35(4), 403–440. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.01.006>
- Qin, X., Raj, R. M., Liao, X. F., Shi, W., Ma, B., Gong, S. Q., ... Zhou, B. (2014). Using rigidly fixed autogenous tooth graft to repair bone defect: An animal model. *Dental Traumatology*, 30(5), 380–384. <https://doi.org/10.1111/edt.12101>

- Rao, S. H., Harini, B., Shadamarshan, R. P. K., Balagangadharan, K., & Selvamurugan, N. (2017). Natural and synthetic polymers/bioceramics/bioactive compounds-mediated cell signaling in bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.029>
- Ravindran, S., & George, A. (2015). Dentin Matrix Proteins in Bone Tissue Engineering (Vol. 881, pp. 129–142). https://doi.org/10.1007/978-3-319-22345-2_8
- Rezwan, K., Chen, Q. Z., Blaker, J. J., & Boccaccini, A. R. (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27(18), 3413–3431. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.039>
- Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), 1–19. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>
- Rosales-Rocabado, J. M., Kaku, M., Kitami, M., Akiba, Y., & Uoshima, K. (2014). Osteoblastic differentiation and mineralization ability of periosteum-derived cells compared with bone marrow and calvaria-derived cells. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 72(4), 694.e1–694.e9. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2013.12.001>
- Rosset, E. M., & Bradshaw, A. D. (2016a). SPARC/osteonectin in mineralized tissue. *Matrix Biology*, 52–54(3), 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.02.001>
- Rosset, E. M., & Bradshaw, A. D. (2016b). SPARC/osteonectin in mineralized tissue. *Matrix Biology*, 52–54, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.02.001>
- Rothem, D. E., Rothem, L., Dahan, A., Eliakim, R., & Soudry, M. (2011). Nicotinic modulation of gene expression in osteoblast cells, MG-63. *Bone*, 48(4), 903–909. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.12.007>
- Sabir, M. I., Xu, X., & Li, L. (2009). A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *Journal of Materials Science*, 44(21), 5713–5724. <https://doi.org/10.1007/s10853-009-3770-7>
- Saeed, K. W., Gataa, I. S., & Garib, B. T. (2015). Fine calcified human dentin particles grafts in experimental bone defects in rabbit femur accelerate bone healing and maturation. *International Journal of Dental Science and Research*, 2(1), 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijdsr.2015.02.002>
- Sathyendra, V., & Darowish, M. (2013). Basic science of bone healing. *Hand Clinics*, 29(4), 473–481. <https://doi.org/10.1016/j.hcl.2013.08.002>
- Schmidt-Bleek, K., Schell, H., Schulz, N., Hoff, P., Perka, C., Buttgerit, F., ... Duda, G.

- N. (2012). Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade. *Cell and Tissue Research*, 347(3), 567–573. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1205-7>
- Scolaro, J. A., Schenker, M. L., Yannascoli, S., Baldwin, K., Mehta, S., & Ahn, J. (2014). Cigarette Smoking Increases Complications Following Fracture. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 96(8), 674–681. <https://doi.org/10.2106/JBJS.M.00081>
- Seong, J. M., Kim, B.-C., Park, J.-H., Kwon, I. K., Mantalaris, A., & Hwang, Y.-S. (2010). Stem cells in bone tissue engineering. *Biomedical Materials*, 5(6), 62001. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/5/6/062001>
- Shang, Q., Wang, Z., Liu, W., Shi, Y., Cui, L., & Cao, Y. (2001). Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. *The Journal of craniofacial surgery*, 12(6), 586–93–5. <https://doi.org/10.1097/00001665-200111000-00017>
- Shibuya, N., & Jupiter, D. C. (2015). Bone Graft Substitute: Allograft and Xenograft. *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*, 32(1), 21–34. <https://doi.org/10.1016/j.cpm.2014.09.011>
- Shiraishi, N., Anada, T., Honda, Y., Masuda, T., Sasaki, K., & Suzuki, O. (2010). Preparation and characterization of porous alginate scaffolds containing various amounts of octacalcium phosphate (OCP) crystals. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(3), 907–914. <https://doi.org/10.1007/s10856-009-3911-1>
- Shirasu, N., Ueno, T., Hirata, Y., Hirata, A., Kagawa, T., Kanou, M., ... Sano, K. (2010). Bone formation in a rat calvarial defect model after transplanting autogenous bone marrow with beta-tricalcium phosphate. *Acta Histochemica*, 112(3), 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2009.01.003>
- Sigl, V., & Penninger, J. M. (2014). RANKL/RANK - From bone physiology to breast cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 25(2), 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.01.002>
- Silva, I., & Branco, J. C. (2011). Rank/RANKL/OPG: Literature review. *Acta Reumatologica Portuguesa*, 36(3), 209–218.
- Silva, M. J., Brodt, M. D., Wopenka, B., Thomopoulos, S., Williams, D., Wassen, M. H., ... Bank, R. A. (2005). Decreased Collagen Organization and Content Are Associated With Reduced Strength of Demineralized and Intact Bone in the SAMP6 Mouse. *Journal of Bone and Mineral Research*, 21(1), 78–88.

- <https://doi.org/10.1359/JBMR.050909>
- Simonet, W. ., Lacey, D. ., Dunstan, C. ., Kelley, M., Chang, M.-S., Lüthy, R., ... Boyle, W. . (1997). Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell*, 89(2), 309–319. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80209-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80209-3)
- Stolzing, A., Jones, E., McGonagle, D., & Scutt, A. (2008). Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Consequences for cell therapies. *Mechanisms of Ageing and Development*, 129(3), 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2007.12.002>
- Sugars, R. V, Milan, A. M., Brown, J. O., Waddington, R. J., Hall, R. C., & Embery, G. (2003). Molecular interaction of recombinant decorin and biglycan with type I collagen influences crystal growth. *Connective tissue research*, 44 Suppl 1, 189–95. Obtido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12952196>
- Susmita Bose, Mangal Roy, and A. B. (2012). Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol.*, 30(10), 546–554. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.005>.Recent
- Suzuki, O., & Anada, T. (2013). Synthetic octacalcium phosphate: a possible carrier for mesenchymal stem cells in bone regeneration. *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference, 2013*, 397–400. <https://doi.org/10.1109/EMBC.2013.6609520>
- Swetha, M., Sahithi, K., Moorthi, A., Srinivasan, N., Ramasamy, K., & Selvamurugan, N. (2010). Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.03.015>
- Szpalski, C., Barbaro, M., Sagebin, F., & Warren, S. M. (2012). Bone Tissue Engineering: Current Strategies and Techniques—Part II: Cell Types. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 18(4), 258–269. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2011.0440>
- Szpalski, C., Wetterau, M., Barr, J., & Warren, S. M. (2011). Bone Tissue Engineering: Current Strategies and Techniques Part I-Scaffolds. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 18(4), 1–39. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2011.0427>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2013). Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. *Development*, 140(12), 2457–2461. <https://doi.org/10.1242/dev.092551>
- Tarantino, U., Saturnino, L., Scialdoni, A., Feola, M., Liuni, F. M., Tempesta, V., &

- Pistillo, P. (2013). Fracture healing in elderly patients: New challenges for antiosteoporotic drugs. *Aging Clinical and Experimental Research*, 25(1 SUPPL.). <https://doi.org/10.1007/s40520-013-0096-8>
- Teng, S., Liu, C., Krettek, C., & Jagodzinski, M. (2014). The application of induced pluripotent stem cells for bone regeneration: Current progress and prospects. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, 20(4), 328–339. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2013.0301>
- Thesleff, T., Lehtimäki, K., Niskakangas, T., Mannerström, B., Miettinen, S., Suuronen, R., & Öhman, J. (2011). Cranioplasty with adipose-derived stem cells and biomaterial: A novel method for cranial reconstruction. *Neurosurgery*, 68(6), 1535–1540. <https://doi.org/10.1227/NEU.0b013e31820ee24e>
- Thomson, J. A., Itskovitz-eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (2012). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts, 282(5391), 1145–1147. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- Thrivikraman, G., Athirasala, A., Twohig, C., Boda, S. K., & Bertassoni, L. E. (2017). Biomaterials for Craniofacial Bone Regeneration. *Dental Clinics of North America*, 61(4), 835–856. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2017.06.003>
- Tsuda, E., Goto, M., Mochizuki, S., Yano, K., Kobayashi, F., Morinaga, T., & Higashio, K. (1997). Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*, 234(234), 137–142. <https://doi.org/S0006291X97966031> [pii]
- Tsuda, K., Nishio, I., & Masuyama, Y. (2001). Bone Mineral Density in Women, 704–707.
- Tye, C. E., Rattray, K. R., Warner, K. J., Gordon, J. A. R., Sodek, J., Hunter, G. K., & Goldberg, H. A. (2003). Delineation of the hydroxyapatite-nucleating domains of bone sialoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 7949–7955. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211915200>
- Vasseur, A., Bruffaerts, J., & Marek, I. (2016). Remote functionalization through alkene isomerization. *Nature Chemistry*, 8(3), 209–219. <https://doi.org/10.1038/nchem.2445>
- Viguet-Carrin, S., Garnero, P., & Delmas, P. D. (2006). The role of collagen in bone strength. *Osteoporosis International*, 17(3), 319–336. <https://doi.org/10.1007/s00198-005-2035-9>

- Villa, M. M., Wang, L., Huang, J., Rowe, D. W., & Wei, M. (2015). Bone tissue engineering with a collagen-hydroxyapatite scaffold and culture expanded bone marrow stromal cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 103(2), 243–253. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33225>
- von Doernberg, M. C., von Rechenberg, B., Bohner, M., Grünenfelder, S., van Lenthe, G. H., Müller, R., ... Auer, J. (2006). In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. *Biomaterials*, 27(30), 5186–5198. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.05.051>
- Wallace, J. M., Chen, Q., Fang, M., Erickson, B., Orr, B. G., & Banaszak Holl, M. M. (2010). Type I Collagen Exists as a Distribution of Nanoscale Morphologies in Teeth, Bones, and Tendons. *Langmuir*, 26(10), 7349–7354. <https://doi.org/10.1021/la100006a>
- Walsh, M. C., & Choi, Y. (2014). Biology of the RANKL-RANK-OPG system in immunity, bone, and beyond. *Frontiers in Immunology*, 5(OCT), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00511>
- Walsh, M. C., Kim, N., Kadono, Y., Rho, J., Lee, S. Y., Lorenzo, J., & Choi, Y. (2006). OSTEOIMMUNOLOGY: Interplay Between the Immune System and Bone Metabolism. *Annual Review of Immunology*, 24(1), 33–63. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090646>
- Wang, P., Liu, X., Zhao, L., Weir, M. D., Sun, J., Chen, W., ... Xu, H. H. K. (2015). Bone tissue engineering via human induced pluripotent, umbilical cord and bone marrow mesenchymal stem cells in rat cranium. *Acta Biomaterialia*, 18(10), 236–248. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.02.011>
- Wang, X., Tolba, E., Der, H. C. S., Neufurth, M., Feng, Q., Diehl-Seifert, B. R., & Müller, W. E. G. (2014). Effect of bioglass on growth and biomineralization of saos-2 cells in hydrogel after 3d cell bioprinting. *PLoS ONE*, 9(11), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112497>
- Wee, J., & Thevendran, G. (2017). The role of orthobiologics in foot and ankle surgery. *EFORT Open Reviews*, 2(6), 272–280. <https://doi.org/10.1302/2058-5241.2.160044>
- Wong, B. B. R., Josien, R., Lee, S. Y., Sauter, B., Li, H., Steinman, R. M., & Choi, Y. (1997). Activation-induced Cytokine , a New TNF Family Member Cell – specific Survival Factor. *Brief Definitive Report*, 186(12), 2075–2080.
- Wu, W., Niklason, L., & Steinbacher, D. M. (2013). The effect of age on human adipose-derived stem cells. *Plastic and reconstructive surgery*, 131(1), 27–37.

- <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3182729cfc>
- Xu, F., & Teitelbaum, S. L. (2013). Osteoclasts: New Insights. *Bone Research*, 1(1), 11–26. <https://doi.org/10.4248/BR201301003>
- Xu, H. H. K., Zhao, L., Detamore, M. S., Takagi, S., & Chow, L. C. (2010). Umbilical cord stem cell seeding on fast-resorbable calcium phosphate bone cement. *Tissue engineering. Part A*, 16(9), 2743–53. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0757>
- Xu, L., Anderson, A. L., Lu, Q., & Wang, J. (2007). Role of fibrillar structure of collagenous carrier in bone sialoprotein-mediated matrix mineralization and osteoblast differentiation. *Biomaterials*, 28(4), 750–761. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.09.022>
- Xu, T., Bianco, P., Fisher, L. W., Longenecker, G., Smith, E., Goldstein, S., ... Young, M. F. (1998). Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. *Nature genetics*, 20(1), 78–82. <https://doi.org/10.1038/1746>
- Xynos, I. D., Edgar, A. J., Buttery, L. D. K., Hench, L. L., & Polak, J. M. (2000). Ionic Products of Bioactive Glass Dissolution Increase Proliferation of Human Osteoblasts and Induce Insulin-like Growth Factor II mRNA Expression and Protein Synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276(2), 461–465. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3503>
- Yang, H.-L., & Sun, H. (2015). Calcium Phosphate Scaffolds Combined with Bone Morphogenetic Proteins or Mesenchymal Stem Cells in Bone Tissue Engineering. *Chinese Medical Journal*, 128(8), 1121. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.155121>
- Yang, X., Gandhi, C., Rahman, M. M., Appleford, M., Sun, L.-W., & Wang, X. (2015). Age-Related Effects of Advanced Glycation End Products (Ages) in Bone Matrix on Osteoclastic Resorption. *Calcified Tissue International*, 97(6), 592–601. <https://doi.org/10.1007/s00223-015-0042-1>
- Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., ... Suda, T. (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(7), 3597–602. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.3597>
- Yoshii, T., Sotome, S., Torigoe, I., Maehara, H., Sugata, Y., Yamada, T., ... Okawa, A. (2010). Isolation of Osteogenic Progenitor Cells from Trabecular Bone for Bone Tissue Engineering. *Tissue Engineering*, 16(3), 933–942.
- Yun, T. J., Chaudhary, P. M., Shu, G. L., Frazer, J. K., Ewings, M. K., Schwartz, S. M.,

- ... Clark, E. a. (1998). OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(11), 6113–6121.
- Zhang, H., Mao, X., Du, Z., Jiang, W., Han, X., Zhao, D., ... Li, Q. (2016). Three dimensional printed macroporous polylactic acid/hydroxyapatite composite scaffolds for promoting bone formation in a critical-size rat calvarial defect model. *Science and Technology of Advanced Materials*, 17(1), 136–148. <https://doi.org/10.1080/14686996.2016.1145532>
- Zhou, J., Yuan, F., Peng, S., Xie, H., Wu, P., Feng, P., ... Shuai, C. (2016). Tunable Degradation Rate and Favorable Bioactivity of Porous Calcium Sulfate Scaffolds by Introducing Nano-Hydroxyapatite. *Applied Sciences*, 6(12), 411. <https://doi.org/10.3390/app6120411>
- Zhou, S., Greenberger, J. S., Epperly, M. W., Goff, J. P., Adler, C., LeBoff, M. S., & Glowacki, J. (2008). Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell*, 7(3), 335–343. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00377.x>
- Zhu, L., Liu, W., Cui, L., & Cao, Y. (2006). Tissue-Engineered Bone Repair of Goat-Femur Defects with Osteogenically Induced Bone Marrow Stromal Cells. *Tissue Engineering*, 12(3), 423–433. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.423>
- Zou, W., & Teitelbaum, S. L. (2010). Integrins, growth factors, and the osteoclast cytoskeleton. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1192, 27–31. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05245.x>